

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE
UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS PLASMINOGEN
IM OSTBAYERISCHEN RAUM

DETLEV NAGL

1985

Aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. H. Cleve

und aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Spann

Qualitative und quantitative

Untersuchungen über das

PLASMINOGEN

im ostbayerischen Raum

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Detlev Nagl

aus

Regensburg

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Schwarzfischer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Überla

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. S. Weidinger

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Mai 1986

A	EINLEITUNG	1
	1. Allgemeine Betrachtungen	1
	2. Aufgabenstellung	2
	3. Plasminogen - ein Überblick	4
	3.1. Fibrinolyse	5
	3.2. Funktion und Struktur des Plasminogens	5
	3.3. Aktivatoren des Plasminogens	6
	3.4. Hemmung der Fibrinolyse	9
	3.5. Wirkungsweise von Plasmin	10
	3.6. Pathophysiologie der Fibrinolyse	12
	3.7. Pathophysiologie des Plasminogens	13
B	DER POLYMORPHISMUS DES PLASMINOGENS: Chronologischer Abriß und Vorstellung verschiedener Darstellungsmethoden	15
C	BESTIMMUNG VON PLG-PHANTYPEN DURCH ELEKTROPHORESE AUF CELLOGEL-FOLIEN UND ANSCHLIESSENDE IMMUNFIXATION	26
	1. Probengewinnung	26
	2. Material und Methoden	26
	2.1. Geräte und Trägermaterial	26
	2.2. Reagenzien und Lösungen	28
	2.3. Durchführung	29
	3. Ergebnisse	35
	3.1. Darstellbarkeit der Phantypen	35
	3.1.1. Abhängigkeit der Darstellbarkeit von der Neura- minidasevorbehandlung	38

	Seite
3.1.2. Andere Einflußfaktoren	41
3.2. Populationsgenetische Untersuchung	44
3.2.1. Verteilung der Phanotypen und Allelfrequenzen	44
3.2.2. Vergleich mit anderen Populationen aus dem deutschen Raum	48
3.2.3. Vergleich mit nicht-deutschen Populationen	52
3.3. Familienuntersuchung	54
3.4. Anwendung in der Paternitätsbegutachtung	57
3.4.1. Eltern-Kind-Untersuchungen	57
3.4.2. Vaterschaftsausschlüsse unter Einbeziehung des PLG-Systems	59
 D. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PLASMINOGEN	
1. Einleitung	62
2. Aufgabenstellung	64
3. Material und Methoden	66
3.1. Messung des Plasminogengehalts mittels Immundiffusion auf Partigenplatten	66
3.1.1. Probengewinnung	66
3.1.2. Material	66
3.1.3. Methode	66
3.1.3.1. Testprinzip	66
3.1.3.2. Durchführung	67
3.2. Messung der Plasminogenkonzentration und -aktivität mit dem photometrischen Farbstest	69
3.2.1. Probengewinnung	69
3.2.2. Material	69

- III -

	Seite
3.2.2.1. Geräte	69
3.2.2.2. Reagenzien	69
3.2.3. Methode	70
3.2.3.1. Testprinzip	70
3.2.3.2. Durchführung	71
3.3. Normalbereiche	72
4. Ergebnisse	73
4.1. Unterschiede in der Plasminogenkonzentration und -aktivität zwischen den verschiedenen PLG-Phänotypen	73
4.2. Direkter Vergleich der Ergebnisse beider Meßmethoden	78
4.3. Abhängigkeit der Plasminogenkonzentration und -aktivität vom Lebensalter	80
4.4. Geschlechtsabhängige Unterschiede der Plasminogenkonzentration und -aktivität	84
4.5. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	86
4.6. Proben-Alterungs-Versuch	87
E DISKUSSION	92
1. Kritik der Methoden	92
1.1. Immunfixationselektrophorese auf Cellogelfolien	92
1.2. Konzentrations- und Aktivitätsmessung von Plasminogen	94
2. Kritik der Ergebnisse	96
F ZUSAMMENFASSUNG	100
G LITERATURVERZEICHNIS	103-107



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554815_0095

A EINLEITUNG

1. Allgemeine Betrachtungen

Das Plasminogen ist in den letzten Jahren vor allem auf 2 Gebieten in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt: Durch den Polymorphismus seiner Phanotypen ist es inzwischen zu einem festen und allgemein als recht wertvoll betrachteten Bestandteil des Untersuchungsrepertoires der Humangenetiker und Paternitätsgutachter geworden.

Auf der anderen Seite hat die Labormedizin in der letzten Zeit immer mehr diagnostische Methoden entwickelt, die Aktivität und Konzentration von Plasminogen in Plasma und Serum zu messen. Dadurch ist es möglich geworden, die Bestimmung von Plasminogen als Parameter bei Störungen der Fibrinolyse und auch als Indikator für zahlreiche über den Gerinnungsablauf hinausgehende Erkrankungen im Routinebetrieb durchzuführen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei der Untersuchung von Plasminogen beide Aspekte - den qualitativen (Phanotypisierung) und den quantitativen (Konzentrations- und Aktivitätsmessung) - zu berücksichtigen und mögliche Korrelationen zwischen den Ergebnissen beider Untersuchungsgänge zu erforschen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf dem 18. Kongreß der Internationalen Gesellschaft für Bluttransfusion, München 1984, als wissenschaftliches Poster veröffentlicht (20).

2. Aufgabenstellung

2.1. Von den verschiedenen Möglichkeiten, die Phänotypen des Plasminogens darzustellen, wurde die Elektrophorese auf Cellogeleffolien mit anschließender Immunfixation ausgewählt. Die Absichten dieser Untersuchung waren folgende:

1.) Es sollte die praktische Anwendbarkeit der Methode überprüft werden unter Berücksichtigung folgender Aspekte:

- Darstellbarkeit und Ablesbarkeit der verschiedenen (häufigen und seltenen) Phänotypen
- Zeit- und Materialaufwand
- Reproduzierbarkeit
- Fehlerquellen und Störfaktoren

2.) Es sollten weitere populationsgenetische Daten über den Polymorphismus des Plasminogens erhoben werden, da bisher noch keine Daten aus dem ostbayerischen Raum vorliegen und auch aus anderen Gebieten nur relativ wenige Ergebnisse bekannt geworden sind. Auf Grund der Untersuchungen ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Verteilung der PLG-Phänotypen im ostbayerischen Raum
- Berechnung der Allelfrequenzen
- Vergleich der Ergebnisse mit anderen populationsgenetischen Untersuchungen im deutschen Raum
- Vergleich mit Untersuchungen aus dem nichtdeutschen Raum

3.) Es sollte der Informationsgewinn einer Aufnahme der PLG-Typisierung in die Paternitätsbegutachtung überprüft werden. Gutachtenmaterial wurde deswegen vorwiegend unter 2 Aspekten untersucht:

- Bestätigung des kodominant - autosomalen Erbganges von PLG mittels Vater-, Mutter- und Kinduntersuchungen.
- Häufigkeit des Vaterschaftsausschlusses
 - a) mit Ausschluß im PLG-System
 - b) ohne Ausschluß im PLG-System

4.) Im Rahmen einer Familienuntersuchung sollte der Erbgang eines sogenannten seltenen PLG-Phänotyps überprüft und somit eine Auslegung von Artefakten als Sondertypen ausgeschlossen werden.

2.2. Für die quantitativ-funktionelle Untersuchung von Plasminogen wurden 2 Methoden verwendet:

Die Bestimmung des Plasminogenserumgehalts mittels Immundiffusion auf M-Partigen-Platten (Fa. Behring) und die Messung der Plasminogenkonzentration bzw. - Aktivierbarkeit mit einem photometrischen Farbstest (Fa. Boehringer).

Ziele dieser Untersuchungen waren:

1.) Vergleich der Resultate mit den publizierten Norm- und Referenzbereichen; Überprüfung der Methode hinsichtlich ihres Nutzens beim screening eines größeren Kollektivs.

- 2.) Überprüfung von Korrelationen zwischen PLG-Konzentration und Geschlechtsverteilung
- 3.) Bewertung von Zusammenhängen zwischen PLG-Gehalt und Lebensalter
- 4.) Konzentrations- und Aktivitätsabnahme des Plasminogens in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der Seren und Plasmen

2.3. Die Verbindung zwischen "qualitativer" und "quantitativer" Untersuchung sollte schließlich durch einen Vergleich der verschiedenen PLG-Phänotypen mit den jeweils für einen Phänotyp berechneten Plasminogen-Durchschnittskonzentrationen hergestellt werden. Vor allem die Frage einer möglichen quantitativen oder funktionellen Defizienz der Sondernotypen gegenüber den häufigen Phänotypen sollte hier abgeklärt werden. Außerdem sollten Zusammenhänge zwischen der Darstellbarkeit der PLG-Phänotypen mittels der Immunfixationselektrophorese auf Cellogeleffolien und den Plasminogenkonzentrationen der entsprechenden Seren in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer untersucht werden.

3. Plasminogen - ein Überblick

Bevor wir uns den einzelnen Untersuchungen und ihren Ergebnissen zuwenden, ist es angezeigt, Biochemie, Physiologie und Pathophysiologie des Plasminogens zumindest zu skizzieren. Es ist der Wissenschaft in den letzten Jahren gelungen, immer tiefer in die komplexen Abläufe des Gerinnungssystems vorzudringen (31). Dabei konnte auch die Funktion und Struktur des Plasminogens in zunehmendem Maße geklärt werden (15).

3.1. Fibrinolyse

Im Gerinnungssystem stellt die Fibrinolyse den Gegenpart zu den gerinnungsfördernden Prozessen dar und trägt damit zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei. Wir verstehen unter Fibrinolyse die proteolytische Auflösung des auf Grund des Gerinnungsablaufs gebildeten Fibringerinnsels, wodurch die volle Durchgängigkeit des zuvor ladierten Gefäßes wieder erreicht wird und der Blutfluß aufrecht erhalten bleibt. Das wirksame, gerinnauflösende Enzym ist das Plasmin, das aus der inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen entsteht.

3.2. Plasminogen - Funktion und Struktur

Plasminogen ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 90.000 Dalton. Elektrophoretisch ist es den β -Globulinen zuzuordnen. Das Molekül besteht aus einer Peptidkette von 790 Aminosäuren, deren N-terminales Ende Glutaminsäure darstellt. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert, was unter anderem durch die interessante Beobachtung bestätigt wurde, daß nach einer Lebertransplantation im Serum des Transplantatempfängers die Plasminogenphenotypen des Spenders gefunden wurden (17).

Eigentlich fibrinolytisch wirksam ist - wie eben erwähnt - nicht das Plasminogen, sondern seine aktivierte, umgewandelte Form: das Plasmin. Seine hohe Bindungsaffinität zu Fibrinogen und Fibrin, den natürlichen Substraten der Fibrinolyse, verdankt das Plasmin dem Ersatz des N-terminalen Glutamins durch Lysin. Diese durch eine limitierte Proteolyse bedingte Umwandlung von inaktivem Glu-Plasminogen zu aktivem Lys-Plasmin kann über zwei Wege erfolgen:

Der "langsame" Weg führt vom Glu-Plasminogen (Halbwertszeit 2 Tage) zum Glu-Plasmin und weiter zum Lys-Plasmin. Im "schnellen" Weg wandelt sich Glu-Plasminogen in Lys-Plasminogen (Halbwertszeit ungefähr 1 Tag) um, so daß beide Plasminogenformen - Lys- und Glu-Plasminogen - nebeneinander existieren. Lys-Plasminogen bildet sich jedoch 20x schneller zu Lys-Plasmin um als Glu-Plasminogen.

Während die autolytische Umwandlung der N-terminalen Aminosäuren die Zunahme der Bindungsaffinität zu Fibrin und Fibrinogen bewirkt, ist ein anderer proteolytischer Prozeß für die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin, also für die eigentliche Aktivierung verantwortlich. Unter dem Einfluß von Aktivatoren wird nämlich die Polypeptidkette des Glu- oder Lys-Plasminogens so gespalten, daß eine zweikettige Struktur entsteht. Die beiden Ketten des nunmehr entstandenen Plasmins sind in eine schwere und eine leichte zu unterscheiden. Die schwere Kette (heavy chain) trägt die Lysin-Bindungsstelle, die leichte Kette (light chain) das aktive Zentrum mit der Aminosäure Serin. Dieses Serin ist durch seine hydrolytische Wirkung auf Peptidbindungen in erster Linie für die proteolytische Aktivität des Plasmins verantwortlich (Plasminogen wird deswegen zu den Serinproteasen gezählt). Gleichzeitig mit der Aufspaltung in Ketten findet auch eine Konformationsänderung des Molekuls in Form einer Faltung der L-Kette statt, die die Anlagerung des Substrats an das aktive Zentrum des Plasmins ermöglicht (Abb. 1).

3.3. Aktivatoren des Plasminogens (Abb. 2)

Die eben erwähnte Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin wird durch sogenannte Aktivatoren eingeleitet oder ausgeführt, die in 3 Klassen zu unterteilen sind:

1.) Endogene Aktivatoren

Hierunter sind die Faktoren der sogenannten Kontakthase der Gerinnung, vor allem der Faktor XII und das Kallikrein, zu verstehen, die Plasminogen in Plasmin umwandeln können. Das heißt also, daß bereits bei Einsetzen des Gerinnungsablaufs auch der Prozeß der Fibrinolyse eingeleitet wird, um die Homöostase weitgehend zu wahren.

2.) Exogene Aktivatoren

Hierzu zählen die Endothel- und Gewebsaktivatoren (tissue plasminogen activator oder t-PA), die sich außer in der Leber in fast allen Körpergeweben finden lassen. Einen besonders hohen Gehalt an t-PA scheinen Lunge, Niere, Prostata und Plazenta zu haben. Gewebsaktivatoren spielen

Abb. 1 Aktivierung von Glu-Plasminogen zu Lys-Plasmin
(modifiziert nach HEIMBURGER)

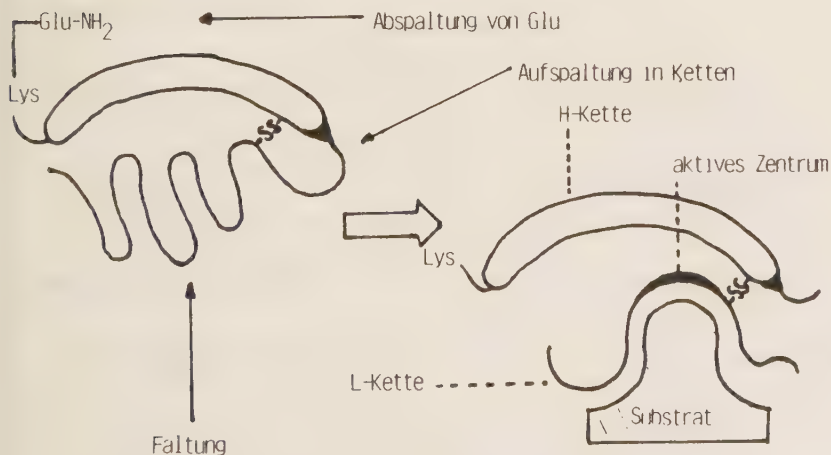
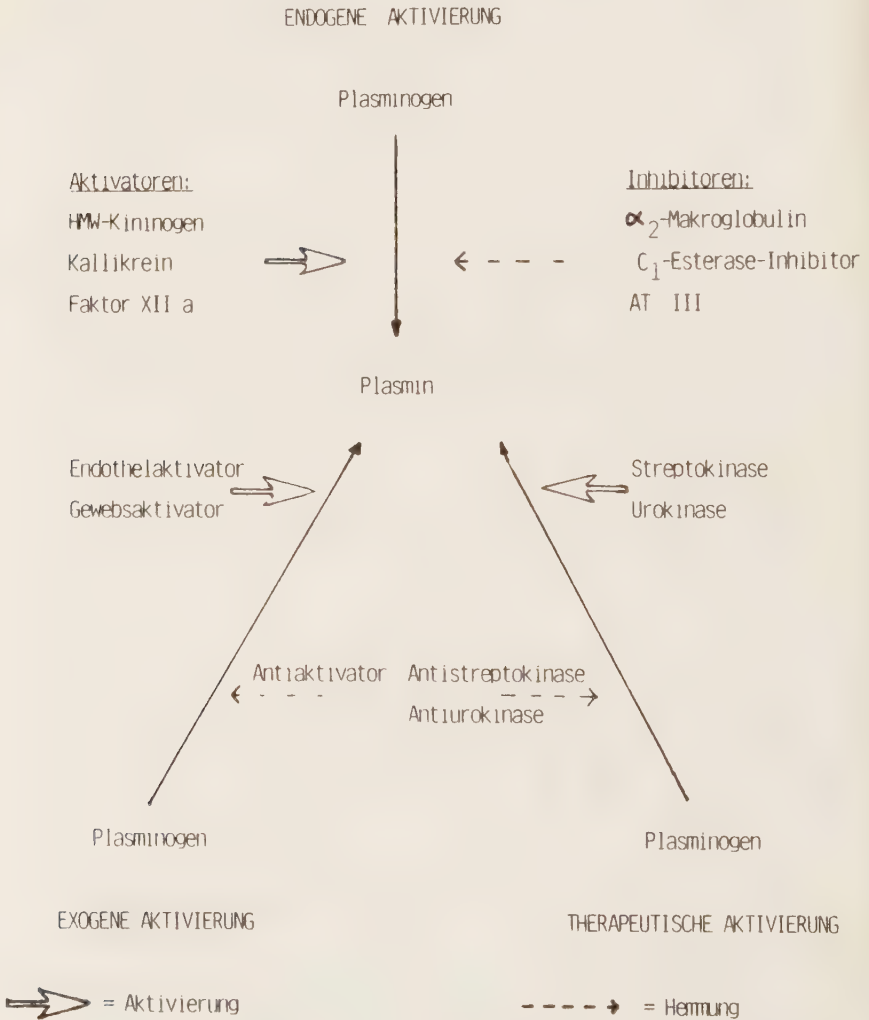


Abb. 2 Aktivierung der Fibrinolyse (nach Spaethe)



auch eine große Rolle bei der extravasalen Fibrinolyse, bei der Wundheilung und bei Entzündungsvorgängen. Man nimmt an, daß sie in Tumorzellen für das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors verantwortlich sind (31).

3.) Therapeutische Aktivatoren

Hierunter sind die Urokinase und die Streptokinase zu rechnen, die ja schon seit einiger Zeit zur therapeutischen Lysebehandlung eingesetzt werden. Urokinase wird aus Urin gewonnen und kann Plasminogen direkt zu Plasmin umwandeln. Streptokinase, die aus β -hämolyisierenden Streptokokken gewonnen wird, muß dagegen erst einen Komplex mit Plasminogen eingehen, um dann über eine Konformationsänderung und die anschließende enzymatische Proteolyse die Aktivierung von Plasminogen durchzuführen. Man bezeichnet es deswegen als indirekten Aktivator. Die therapeutische Lyse mit t-PA scheint sich als eine mögliche Methode der Zukunft abzuzeichnen (31).

3.4. Hemmung der Fibrinolyse

Die Hemmung der Fibrinolyse ist - wie aus dem zuvor Beschriebenen hervorgeht - auf 2 Stufen möglich: auf der Stufe der Aktivatoren können die Antiaktivatoren, auf der Stufe des Plasmins die Antiplasmin inhibitorisch wirken. Weiter ist wiederum zwischen physiologischen und therapeutisch eingesetzten Inhibitoren zu unterscheiden.

1.) Physiologische Inhibitoren

a) Antiaktivatoren

Es konnten bereits Hemmstoffe gegen Urokinase und t-PA isoliert werden. Eine endgültige Benennung und Analyse dieser Inhibitoren steht

aber noch aus, wenn man vom C1-Esterase-Inhibitor absieht, der auch ein bedeutender Hemmstoff der Fibrinolyseaktivierung zu sein scheint.

b) Antiplasmin

Hier sind vor allem das α_2 -Antiplasmin und das α_2 -Makroglobulin zu nennen. Da sich diese Inhibitoren an die Lysinbindungsstellen des Plasmins heften, können sie nur wirksam werden, wenn diese Bindungsstellen nicht schon an Fibrin gebunden sind. Sie reagieren also vorwiegend mit freiem Plasmin im Plasma.

2.) Therapeutische Inhibitoren

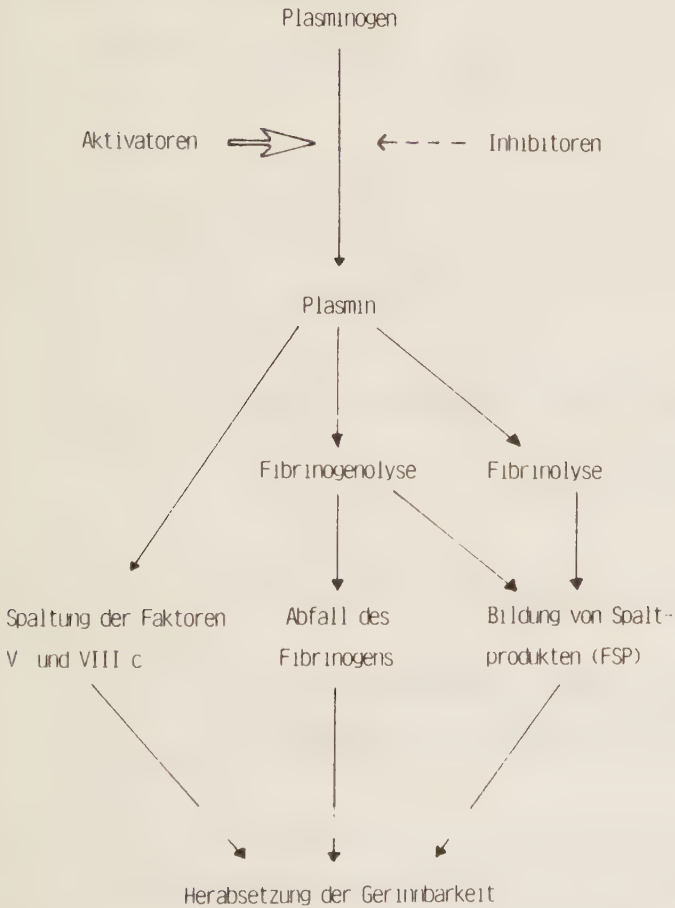
Bei Blutungen infolge einer überschießenden Lyse - endogen und therapeutisch bedingt - können ϵ -Aminocaprinsäure und Tranexamsäure (AMCHA) gegeben werden, die die Lysinbindungsstellen des Plasminogens besetzen. Ebenfalls zum Einsatz kommt Aprotinin, das Proteasen im allgemeinen und damit auch Plasmin zu hemmen vermag.

3.5. Wirkungsweise von Plasmin (Abb. 3)

Plasmin spaltet Fibrin und Fibrinogen, die Endprodukte des Gerinnungsablaufs also, in Fibrin- bzw. Fibrinogen-Spaltprodukte (FSP). Dieser Vorgang der Fibrinolyse beschränkt sich auf den Thrombus, der durch seinen hohen Gehalt an Fibrin viel Plasminogen und Plasmin binden kann. Freies Plasmin kann freies Fibrinogen nicht binden und lysieren, da es sofort durch α_2 -Antiplasmin im Plasma inhibiert wird.

Durch Spaltung des Fibrinogens entstehen die definierten Fragmente X, Y, D und E. Diese einzelnen Fragmente üben ihrerseits hemmende Einflüsse auf die Gerinnung aus: weitere Abspaltungen von Fragment X hemmen die Thrombozyten-

Abb. 3 Funktion des Plasminogens, bzw. des Plasmins



aggregation. Fragment Y inhibiert Thrombin und die Fragmente X, Y, D können außerdem mit Fibrinmonomeren Komplexe bilden, die nicht oder nur schwer vernetzt werden können.

Außer Fibrinogen und Fibrin kann Plasmin überdies auch noch die Gerinnungsfaktoren V und VIII spalten und so die Gerinnbarkeit des Blutes parallel zur Auflösung der Gerinnsel auf verschiedenen Stufen erschweren.

3.6. Pathophysiologie der Fibrinolyse

Entsprechend den vorgestellten Mechanismen kann die Fibrinolyse durch folgende Umstände verstärkt sein (1):

- 1.) Vermehrung der Aktivatoren
- 2.) Vermehrte Bildung von Plasminogen bzw. Plasmin
- 3.) Störung der Fibrinbildung
- 4.) Mindergehalt an Hemmstoffen der Fibrinolyse

Eine Abschwächung der fibrinolytischen Aktivität kann zu Thrombosen führen. Diese kann entstehen durch:

- 1.) eine Verminderung der Plasminogenaktivatoren
- 2.) erworbenen oder angeborenen Plasminogenmangel

3.7. Pathophysiologie des Plasminogens

Die Erhöhung oder Erniedrigung des Plasminogenspiegels kann durch verschiedenste, definierte Störungen oder Erkrankungen verursacht sein. Die Messung

der Plasminogenkonzentration kann deshalb auch wichtige Hinweise auf Erkrankungen bestimmter Genese geben (12, 31).

1.) Erhöhung der Plasminogenkonzentration

Um über 100% erhöhte Plasminogenspiegel wurden gefunden bei Patienten mit

- a) Diabetes mellitus
- b) Carcinomen, wobei vor allem Patienten mit Prostatakrebs sehr hohe Plasminogenkonzentrationen aufweisen.

Außerdem ist der Plasminogenspiegel bei

- c) Östrogentherapie und
- d) reaktiv bei Entzündungen (Zugehörigkeit zu den Akutphasenproteinen!) erhöht.

2.) Erniedrigung der Plasminogenkonzentration

Ein Abfall des Plasminogenspiegels wird bei folgenden Störungen bzw. Abläufen gefunden:

- a) Verbrauchskoagulopathie und endogene Hyperfibrinolyse
- b) fibrinolytische Therapie
- c) Lebererkrankungen, vor allem Zirrhose (mangelhafte Plasminogenbildung).
- d) Ebenfalls wesentlich erniedrigte Plasminogenspiegel (eine gewisse Minderkonzentration an Plasminogen ist bei Neugeborenen physiologisch) wurden bei unreifen Neugeborenen gemessen, die am Syndrom der hyalinen Membranen der Lunge litten. Da diese Membranen aus Fibrin bestehen, lösen sie sich bei einer herabgesetzten fibrinolytischen Aktivität

nur ungenügend oder gar nicht. Folge davon ist eine schwere Störung des Gasaustausches. Hier scheint die Gabe von Human-Plasminogen als Therapeutikum neue Wege zu öffnen. Die Kontrolle der Plasminogenkonzentration dürfte sich hier gut für eine Überprüfung des Krankheitsverlaufs bzw. des Therapieerfolgs eignen (31).

überdies sind erniedrigte Plasminogenspiegel möglich

e) nach größeren operativen Eingriffen

f) bei glomerulärer Proteinurie und

g) bei der äußerst seltenen kongenitalen Dysplasminogenämie,

bei der funktionell defektes Plasminogen bei immunologisch als normal imponierenden Plasminogenkonzentrationen gefunden wird (1).

B DER POLYMORPHISMUS DES PLASMINOGENS:

Chronologischer Abriss und Vorstellung verschiedener Darstellungsmethoden

Bereits 1971 veröffentlichte SACHS, der sich in den Jahren zuvor schon mehrmals mit immunologischen Aspekten und Problemen des Plasminogens auseinandergesetzt hatte, seine Untersuchungen über "Immunologisch nachweisbare Unterschiede in der Struktur von Plasminogen" (29). Es war ihm gelungen, mit multispezifischen Antiplasminogenserum, die durch Absorption mit plasminogenfreiem Plasma nahezu monospezifisch gemacht worden waren, im Agargelddiffusionstest und in der Immunelektrophorese menschliche Plasmen in "3 verschiedenen, aber konstant reproduzierbaren Reaktionsmustern" darzustellen. Entsprechend den Reaktionsbildern teilte er die untersuchten Plasmen drei verschiedenen Plasminogentypen I, II und III zu.

Unter der hypothetischen Voraussetzung, daß es sich bei den beobachteten Reaktionstypen um Erbmerkmale handelte, und aufgrund von Eltern-Kind-Untersuchungen nahm SACHS ein Zwei-Allelen-Modell an. Darin wurden die Phänotypen I und III mit einer Häufigkeit von durchschnittlich 47% (I) und 2 - 5% (III) die homozygoten Formen, der Phänotyp II mit einer Häufigkeit von ca. 51% die mischerbige, also heterozygote Form darstellen. Die Annahme, mit seiner Untersuchung genetisch determinierte Gruppen des Plasminogens gefunden zu haben, betrachtete SACHS als "zwar nicht widerlegt, aber auch noch nicht bewiesen."

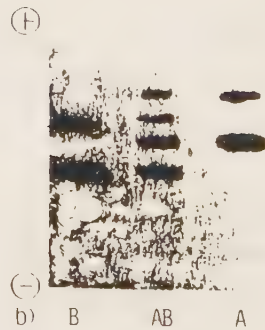
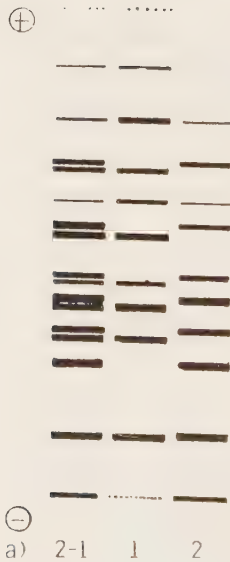
Den Durchbruch bei der Plasminogentypisierung schafften etwa gleichzeitig (1979/80) sowohl HOBART als auch RAUM mit ihren gleichlautenden Untersuchungen "Genetic polymorphism of human plasminogen" (7, 27).

HOBART konnte mit Hilfe der Isoelektrofokussierung (IEF) auf Polyacrylamid-

Gelen und anschließendem fibrinolytischen overlay, also der sandwichartigen Auflage eines Fibrin-"clots", 3 verschiedene Bandenmuster (bandpatterns) darstellen, die er 3 Plasminogenphanotypen zuordnete (Abb. 4). Er beobachtete zwei Muster, die vollkommen verschieden voneinander waren und die er mit den Ziffern 1 und 2 versah, und ein Muster, das wie eine Mischung der beiden anderen aussah und das er als 2 - 1 bezeichnete. Er nahm an, daß die Phantypen 1 und 2 die homozygoten Plasminogenformen in einem 2-Allelen-System darstellten, während der Phantyp 2 - 1 die heterozygote Form sei. Vater-Mutter-Kind-Untersuchungen bestätigten eine autosomal-kodominante Vererbung der zugrundeliegenden Allele PLG*1 und PLG*2. Auf die populationsge-

Abb. 4a Skizze der von HOBART dargestellten PLG-Phantypen 2-1, 1 und 2

4b Abbildung der von RAUM dargestellten PLG-Phantypen A, B und AB
(nach Neuraminidase-Behandlung)



netischen Daten, die HOBART erhob und die Verteilungsunterschiede zwischen Engländern und Bewohnern von Gambia aufzeigten, wird an anderer Stelle eingegangen.

RAUM führte seine PLG-Phänotypisierung ebenfalls mit der IEF auf Polyacrylamid-Gel durch. Zur Darstellung verwendete er aber entweder die Immunfixation durch monospezifische Anti-Human-Plasminogen-Antisera mit anschließender Färbung in Coomassieblau oder die Behandlung der Gele mit Urokinase und anschließender Bedeckung mit einem Casein-Agarose-Gel (=caseinolytischer overlay nach Urokinase-Aktivierung). Außerdem behandelte RAUM die untersuchten Seren und Plasmen mit Neuraminidase vor und erreichte dadurch eine Reduzierung der Banden und somit eine leichtere Lesbarkeit und eine bessere Unterscheidbarkeit der Bandenmuster der verschiedenen Phänotypen. RAUM fand auf Grund der Bandenmuster ebenso wie HOBART 3 verschiedene PLG-Phänotypen, von denen einer als Mischform der beiden anderen imponierte. Die beiden als homozygot angenommenen Typen bezeichnete er als PLGN A und PLGN B (A für weiter von der Auftragstelle entfernt, also im aciden Bereich, B für näher an der Auftragstelle, also im basischen Bereich liegend), die als heterozygot proponierte Form als PLGN AB (Abb. 4b). Die entsprechenden Allele nannte er PLGN*A und PLGN*B.

Darüberhinaus fand RAUM aber einen kleinen Prozentsatz an Bandenmustern, die sich in keine Gruppe der oben beschriebenen Phänotypen einreihen ließen und die er im Vergleich zu den häufig aufgefundenen Phänotypen (common types) als seltene Varianten interpretierte. Er kennzeichnete sie je nach ihrer Lage zu den Bandenmustern A und B durch das Suffix "r" (für rare), also als PLGN Ar oder PLGN Br. Die entsprechenden Allele subsumierte er unter dem Begriff PLGN*R. Populationsgenetische Untersuchungen bei Weißen ergaben für die Phänotypen A, B und AB und für die entsprechenden Genfrequenzen etwa

gleiche Häufigkeiten wie bei HOBARTS Phanotypen 1, 2 und 2 - 1 innerhalb der englischen Bevölkerung, was RAUM zu der Feststellung veranlaßte: "Presumably, PLG*1 is the same as PLGN*A and PLG*2 is the same as PLGN*B."

Ausgedehnte Mutter-Vater-Kind -und Stammbaumuntersuchungen ließen RAUM ebenfalls den autosomal-kodominanten Erbgang des Plasminogens bestätigen. Seit den Untersuchungen von HOBART und RAUM sind also folgende Feststellungen über den Polymorphismus des Plasminogens möglich, die in den folgenden Jahren bestätigt und erweitert wurden:

- 1.) Das PLG-System ist diallel angelegt.
- 2.) Es gibt 3 sogenannte Haupt-Phanotypen (common types), von denen 2 homozygot (A bzw. 1 und B bzw. 2) und 1 heterozygot (AB bzw. 2 - 1) angelegt sind.
- 3.) Neben den häufigen Typen kommen in geringer Anzahl seltene Typen oder Varianten vor.

Inzwischen hat sich international weitgehend als Abkürzung von Plasminogen das Kurzel PLG (nicht PLGN) und für die begriffliche Unterscheidung der Allele von den Phanotypen die Hinzufügung eines Sternchens vor der Allelkerinzhalt (oder dem Allel-Kennbuchstaben) durchgesetzt.

Beispiele: PLG 2 = homozygoter Phanotyp (genaue Bezeichnung eigentlich PLG 2-2)

PLG 2 - 1 = heterozygoter Phanotyp

PLG*2 = Allel

PLG 2 - R = seltener Phanotyp

PLG*R = seltenes Allel

- 4.) Die den häufigen Typen entsprechenden Allele sind die Gene 1 bzw. A und 2 bzw. B. Daneben existiert eine kleine, aber unbestimmte Anzahl von seltenen Allelen R.
- 5.) Die Vererbung der Allele und Ausbildung der Phänotypen folgt einem kodominant-autosomalen Erbgang.

Auf die grundlegenden Studien von HOBART und RAUM folgten bis zum heutigen Tage weitere Untersuchungen über den Plasminogen-Polymorphismus, die vor allem 3 wesentliche Weiterentwicklungen brachten:

- 1.) Die Darstellungsmethoden wurden vermehrt und verbessert.
- 2.) Die populationengenetischen Daten wurden erweitert und vervollständigt.
- 3.) Seltene Phänotypen bzw. Allele wurden in vermehrtem Maße beobachtet.

MAUFF veröffentlichte 1981 seine populationengenetischen Untersuchungen bei einer westdeutschen Bevölkerungsstichprobe und bei Bewohnern der Kölner Region (17, 18). Er verwendete zur Typisierung 2 Methoden: zum einen die Elektrophorese auf Agarose-Gel und zum anderen die IEF auf Polyacrylamid. Zur Darstellung der PLG-Typen diente ihm sowohl ein fibrinolytischer Overlay als auch die Immunfixation mit Anti-Plasminogen (Abb. 5a). Die ermittelten Phänotypenhäufigkeiten und Genfrequenzen entsprachen etwa den von HOBART und RAUM bei Weißen gefundenen Zahlen.

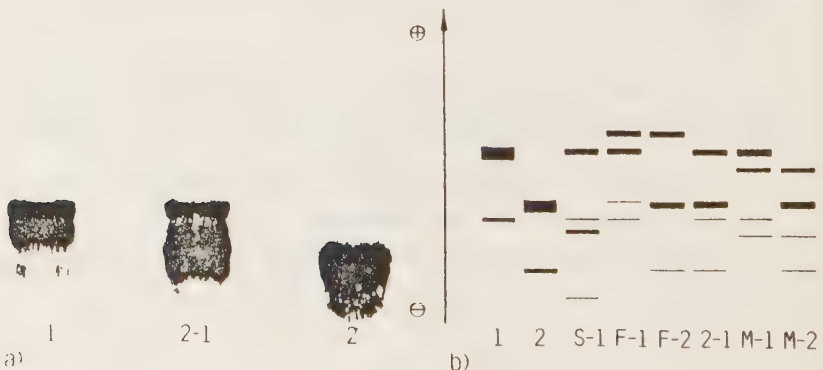
MAUFF wies darauf hin, daß eine sichere Erkennung von seltenen PLG-Varianten nur nach Neuraminidasebehandlung der Seren möglich wäre. Eine berechnete isolierte Ausschlußwahrscheinlichkeit von 20,4% ließ ihn das PLG-System als sehr nützlich für die Anwendung bei Vaterschaftsgutachten bezeichnen. MAUFF übernahm übrigens die Nomenklatur von HOBART mit den Allelen 1, 2 und R und den Phänotypen 1, 2-1, 2, R-1, R-2 und R.

SPIELMANN und KÜHNLE hingegen konstatierten 1982, nachdem sie in ihrem Blutspenderpanel 4 weitere Allotypen des Plasminogens identifizieren konnten, die Existenz von mindestens 7 Allelen und zählten den MAUFF'schen Allelen PLG*1, PLG*2 und PLG*R die von ihnen gefundenen seltenen Allele PLG*3, PLG*4, PLG*5 und PLG*6 hinzu (32). Hier zeigten sich schon gewisse Unterschiede in den Plasminogennomenklaturen der verschiedenen Untersucher ab, die sich in der Zeit darauf noch verstärken sollten. Bei ihrer Nomenklatur orientierten sich SPIELMANN und KÜHNLE an dem von HOBART gemachten Vorschlag, die über PLGN*1 und PLGN*2 hinausgehenden Allele nach ihrer Frequenz in der weißen Bevölkerung und der Reihenfolge ihrer Entdeckung zu numerieren.

Sowohl eine andere Methode als auch eine andere Nomenklatur brachte 1983 HUMMEL vor (8, 11). Er stellte die PLG-Typen mittels Elektrophorese auf Cellogelelfolien und anschließender Immunfixation dar. Dieses Verfahren, das auch bei der vorliegenden Untersuchung verwendet wurde, wird an anderer Stelle noch eingehend besprochen.

Abb. 5a Abbildung der von MAUFF dargestellten PLG-Phänotypen 1, 2 und 2-1

5b Schema der von HUMMEL dargestellten PLG-Phänotypen



HUMMEL konnte mit seiner Darstellungsweise die Anzahl der Banden, mit denen sich homozygote PLG-Phänotypen darstellten, auf 2 - eine Haupt - und eine Minor - Bande - reduzieren. Heterozygote Phänotypen lassen dementsprechend 4 Banden - 2 Haupt - und zwei dazugehörige Minor-Banden - erkennen. Die Ablesbarkeit und Unterscheidbarkeit der Phänotypen war dadurch sehr erleichtert (Abb. 5b). Was die Nomenklatur anbelangt, so behielt HUMMEL die Bezeichnungen 1 und 2 für die Haupt-Allele, ebenso den Oberbegriff R für die seltenen Varianten bei, die er jedoch nach der Lage ihrer Banden zu den Banden der Haupttypen spezifizierte:

Als F wurden Varianten bezeichnet, die in der Elektrophorese besonders schnell (=fast) liefen und deren Banden weiter anodal als die des Typen 1 lagen. Dementsprechend erhielten Varianten "zwischen 1 und 2" (also in der Mitte) die Bezeichnung M und "langsamere Typen" - also mehr kathodal als der Typ 2 liegend - die Bezeichnung S (slow).

Eine vergleichende Untersuchung HUMMELS von Seren, die auch MAUFF mit seiner Methode typisiert hatte, erbrachte übrigens in allen Fällen die gleichen Phänotypen, was die Brauchbarkeit der "Cello-gel-Methode" bekräftigte. Auch LATTKE und KRONE verwendeten für ihre Untersuchungen diese Methodik und konstatierten ebenso wie HUMMEL, daß sie "die PLG-Typisierung durch Immunfixationselektrophorese auf Cello-gel als Trägermaterial für ökonomischer und einfacher für die Anwendung in der forensischen Serologie als die AGE-Technik" hielten (15).

In der Folgezeit nahm mit der Menge an Veröffentlichungen über den Polymorphismus von PLG auch die Zahl der beobachteten Varianten zu. DYKES, NISHIMUKI, KUHNLE (3, 13) und viele andere beschrieben immer neue, seltene Phänotypen in zum Teil unterschiedlichen Nomenklaturen (MAUFF spricht in seinem "Plasminogen Nomenclature proposal" von mindestens 10 verschiedenen Nomenklaturen), so daß schließlich 2 Forderungen hinsichtlich der PLG-Typisierung immer drängender wurden:

- 1.) Es war nötig, international Referenzserien auszutauschen, um sicherzustellen, daß man sich beim Vergleich von Untersuchungsergebnissen auf die gleichen Grundlagen bezog.
- 2.) Es war unumgänglich, endlich zu einer einheitlichen Nomenklatur für das PLG-System - vor allem im Hinblick auf die Zunahme der beobachteten Varianten - zu kommen.

Der Versuch, ein einheitliches Bezeichnungs- und Bezugssystem zu finden, wurde schließlich auf dem 18. Kongreß der Internationalen Gesellschaft für Bluttransfusion, 1984 in München, gemacht. MAUFF hatte die Vorarbeiten für ein dabei eigens anberaumtes PLG-Symposium durch eine Referenzuntersuchung von verschiedenen, bereits typisierten Serien aus internationalen und nationalen Labors geleistet. Er war es auch, der beim Nomenklatur-work-shop den Vorschlag vorlegte, der die breiteste Zustimmung fand (16). Wenn auch die MAUFF'schen Nomenklaturvorschläge noch nicht letztendlich und endgültig von allen PLG-Untersuchern übernommen sind, so scheinen sie doch aufgrund ihrer Übersichtlichkeit, Plausibilität und nicht zuletzt wegen der gelungenen Synthese der bereits existierenden Begriffssysteme in absehbarer Zeit sich allgemein durchsetzen zu können (Abb. 6).

Die von MAUFF proponente Nomenklatur steht auf alphanumerischer Basis. Ausschlaggebend für die Zuordnung von Allelen ist die Lage ihres isoelektrischen Punktes und somit die Höhe ihrer Banden bei der Isoelektrofokussierung.

Für die Benennung der beiden Haupttypen schlägt MAUFF analog zu RAUM die Bezeichnung PLG A (für einen mehr aciden isoelektrischen Punkt) und PLG B (für einen mehr basischen PI), für die entsprechenden Allele die

Abb. 6 Vergleich des Nomenklaturvorschlages von MAUFF mit den bisher von verschiedenen Autoren der russischen Literatur angegebenen Allele, zusammengestellt anhand des von MAUFF initiierten Referenzaustausches 1984 (Majorbanden der entsprechenden Allele auf einer Linie).

Dykes	Eiberg	Humei	Kühnl	Mauff	Nakanura	Nishimukai	Tokunaga	Weidinger	Vorschlag
	9								A3 (+)
3	3	F1	3	F' A2		?	3	Var 2	A2
M	3	F2	4	F'' A1					A1
- 1	1	1	1	1- A	A	1	1	1	A -
B	4(6)	M1	5	M2					M3
D	6(5)	M2	6	M1				Var 1	M2
W	7		8	M M		(C)			M1
- 2	2	2	2	2- B	B	2	2	2	B -
		S1	(7)	S Bx	BlJ	B2	4		Bl
								Var 3	B2 (-)

Bezeichnung $PLG \cdot A$ ($=PLG \cdot 1$) und $PLG \cdot B$ ($=PLG \cdot 2$) vor.

Die seltenen Varianten werden nun entsprechend der Lage ihrer isoelektrischen Punkte zu denen der Haupttypen eingeordnet. Varianten, die ebenfalls im aciden Bereich, aber weiter anodal als A liegen, erhalten je nach ihrem Abstand zu A ein numerisches Suffix, das entsprechend dem Abstand zu A steigt: Also A1, A2, A3 und so fort in anodaler Richtung! Die B-Varianten, die also "basischer" als B liegen, werden in kathodaler Richtung nummeriert. Varianten, die zwischen A und B liegen, werden als M bezeichnet und in anodaler Richtung nummeriert. Sollten weitere Varianten gefunden werden, die zwischen zwei bereits bekannten Varianten lagen, so erhalten sie ein zusätzliches numerisches Suffix. Beispielsweise wurde eine Variante, die zwischen A1 und A2 lag, als A11 bezeichnet.

Diese Nomenklatur imponiert also dadurch, daß sie unbegrenzt erweiterungsfähig ist, ohne dadurch unübersichtlich zu werden.

Obwohl dem Autor der vorliegenden Untersuchung die MAUFF'sche Nomenklatur als sehr vorteilhaft erscheint, wurde sie für diese Arbeit nicht verwendet, da mit der Darstellungsmethode der Immunfixationselektrophorese auch die Nomenklatur von HUMMEL übernommen wurde. Da die Nomenklaturvorschläge von MAUFF erst während des Entstehens dieser Arbeit aktuell wurden, und außerdem ein Teil der vorliegenden Untersuchungen unter Verwendung des HUMMEL'schen Bezeichnungssystems bereits auf dem Internationalen Kongreß der Gesellschaft für Bluttransfusion 1984 veröffentlicht wurde (20), erschien es nicht sinnvoll, die Untersuchungsergebnisse im nachhinein in eine andere Nomenklatur umzuschreiben.

Zum Ende des chronologischen Abrisses über den Polymorphismus von Plasminogen wäre noch anzumerken, daß ebenfalls 1984 SACHS an seine Untersuchung

von 1971 anknüpfte (28). Mit monospezifischen Antiplasminogenserum konnte er Plasmen im Agargelddiffusionstest wiederum in 3 verschiedenen Präzipitationsmustern darstellen. Die Häufigkeiten für die einzelnen Typen ähnelten den von HOBART und RAUM entdeckten Plasminogen-Haupt-Phänotypen, so daß SACHS nicht ausschloß, daß die von ihm dargestellten PLG-Typen I und III (Häufigkeit 59% und 4%) den homozygoten Phänotypen PLG A und PLG B (bzw. PLG 1 und PLG 2) entsprachen, während der Typ II (37%) dem heterozygoten Phänotyp PLG AB (bzw. PLG 2 - 1) gleichkam.

Ein Vergleich der 3 Typen hinsichtlich ihrer fibrinolytischen Aktivität erbrachte geringere Durchschnittsaktivitäten (70%) des Typs III (eventuell also dem Phänotypen PLG 2 entsprechend) im Gegensatz zu den Typen I und II (PLG 1 und PLG 2 - 1), die beide eine Durchschnittsaktivität von 100% aufwiesen.

SACHS folgerte daraus, daß den Plasminogengruppen neben dem genetischen Interesse möglicherweise auch klinische Bedeutung zukomme - ein Aspekt, der ja auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde und auf den an anderer Stelle eingegangen wird.

C BESTIMMUNG VON PLG-PHANTYPEN DURCH ELEKTROPHORESE AUF CELLOGEL-FOLIEN UND ANSCHLIESSENDE IMMUNFIXATION

1. Probengewinnung

Die 484 untersuchten Seren wurden aus venösem Blut (ohne Zusatz von Antikoagulantien) gewonnen, das ungefähr 10 - 11 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt und dann zentrifugiert wurde. Die Blutproben waren freiwilligen Blutspendern im Rahmen einer Blutspende zur routinemäßigen Laboruntersuchung entnommen. Seren, die nicht sofort am Tage der Zentrifugation für die Untersuchung weiterbehandelt werden konnten, wurden bei ca. -37°C eingefroren und kurz vor der Untersuchung aufgetaut.

Um einigermaßen flächendeckende populationsgenetische Daten über den ost-bayerischen Raum erheben zu können, wurden schwerpunkartig etwa gleiche Mengen an Blutproben von Blutspendeterminen an folgenden Orten verwendet: Berching, Abensberg, Langquaid, Dingolfing und Furstenzell (Abb. 7).

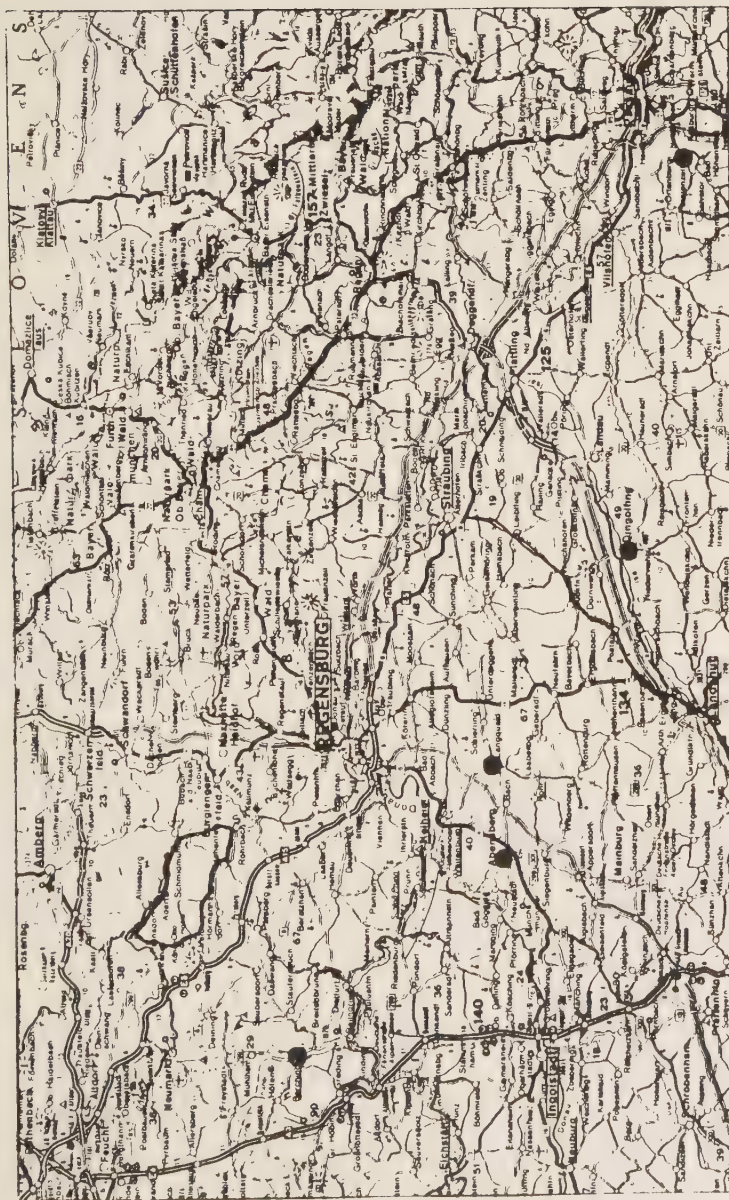
Blutproben, deren Spender auf Grund der Spendeunterlagen als verwandt miteinander vermutet werden mußten, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen, um die Merkmalsverteilung nicht zu verfälschen.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Tragematerial

Als Tragematerial wurden Cellogelfolien aus Cellulose-Acetat mit den Ausmaßen 5,7 cm x 14 cm und einer Schichtdicke von 190 μ verwendet (Biotec-Fischer). Zur Befestigung der Folien dienten sogenannte Einzelstreifen-Brücken (8,5 cm single strip bridges (Biotec-Fischer)). Das Auftragen der Seren auf die Folien erfolgte mit einem 8-Proben-Applicator (multiple

Abb. 7 Geografische Lage der Herkunftsorte der Blutproben (●)



8-p-micro-applicator (Biotec-Fischer)). Die Elektrophorese wurde in der Desaphor-Elektrophoresekammer mit 2 Kunststoffwannen (Desaga) durchgeführt. Als Stromgeber diente das Netzgerät LKB 2103 (LKB) (Abb.8).

2.2. Reagenzien und Lösungen

- Neuraminidase Typ VIII von clostridium perfringens (Sigma)

- Neuraminidase-Puffer:

1 mol/l K_2HPO_4 ; 1 mol/l KH_2PO_4

- Herstellung der Neuraminidase-Lösung:

① 8.71g einmolares K_2HPO_4 ad 50 ml aqua dest.

② 6.80g einmolares KH_2PO_4 ad 50 ml aqua dest.

25 ml von Lösung ① und 25 ml von Lösung ② zusammengeben und pH auf 7 einstellen. In 250 μ l dieser Lösungsmischung 10 Einheiten Neuraminidase Typ VIII (=Inhalt eines Flaschchens) auflösen.

- Elektrophorese-Puffer:

Lösung I (Vorratslösung):

Tris	9.04 g	}	gelöst in 1 l aqua dest.
Glycin	2.81 g		
Barbitursaure	0.258g		
BA-Natriumsalz	3.275g		

Lösung II (Gebrauchslösung):

400 ml von Lösung I

1700 ml aqua dest.

0.860 g NaCl

pH 9.5 einstellen mit 1 n NaOH

- Anti-Human-Plasminogen-Antiserum, monospezifisch (Atlantic Antibodies, M & D)
- 0.9%-ige Kochsalzlösung (zum Wassern)
- Farbelösung (für 200ml) :
 - 196 ml aqua dest.
 - 4 ml Essigsäure 96%
 - 200 mg Nigrosin
- Entfarber:
 - 5%ige Essigsäurelösung

2.3. Durchführung

Je 18 µl der Seren wurden mit je 2 µl der Neuraminidase-Lösung in Eppendorf-Hütchen gut vermischt und mit geschlossenem Hütchendeckel ca. 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur genauen Pipettierung wurde der pipetman-Pipettenhalter (Abimed) verwendet, der mittels einer drehbaren Skala auf solch kleine Pipettiermengen eingestellt werden kann.

Es empfiehlt sich, zuerst die Neuraminidase-Lösung in die Hütchen zu geben, so daß die Pipettenspitze zwischen den Hütchen nicht gewechselt werden muß und man beobachten kann, ob diese Kleinmenge an Lösung auch tatsächlich aus der Pipette auf den Hütchenboden ausgedrückt wurde. Beim Hinzugeben der

Seren sollte man darauf achten, daß Serum und Neuraminidaselosung durch mehrmaliges Aufziehen und Ausdrücken des Pipetteninhalts gut miteinander vermischt werden und daß die Pipettenspitzen vor jedem neuen Serum gewechselt werden.

über Verdünnungsvariationen der Neuraminidaselosung zum sparsameren Verbrauch der sehr teuren Neuraminidase wird an späterer Stelle berichtet. Neuraminidaselosung, die nicht an einem Arbeitstag aufgebraucht wird, kann bis zur nächsten Verwendung eingefroren werden. Rein rechnerisch sollte 250µl Neuraminidaselosung bei einem Verbrauch von 2µl pro zu inkubierendes Serum für ca. 125 Seren ausreichen. Ein Teil der Losung scheint aber doch während der Öffnung der Flaschchen zu verdunsten, bzw. an der Pipettenspitzen-Außenseite hängen zu bleiben und so verloren zu gehen, so daß man mit 250µl Neuraminidase-Losung, bzw. mit einem Flaschchen Neuraminidase Typ VIII nur etwa 90 Serumproben inkubieren kann (Schwankungen zwischen 75 und 96 Inkubationen!).

Die Inkubationsdauer von ca. 18 Stunden sollte nicht wesentlich unterschritten werden, da die Neuraminidasewirkung sonst nicht zur vollen Entfaltung kommt. Bleibt das Serum länger als 2 bis 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, so lassen sich die Banden nur noch schwach bzw. gar nicht mehr darstellen. Inkubierte Seren, die man nicht 1 Tag nach der Inkubation untersuchen kann, sollte man daher einfrieren und sie in einem entsprechenden zeitlichen Abstand zur tatsächlichen Untersuchung auftauen.

Vor dem Auftragen der Serumproben sollte man die Cellogelefolien etwa 10 Minuten in einen kleinen Teil des Elektrophorese-Puffers einlegen. Der restliche größere Teil der Pufferlösung wird in die Wannen der Elektrophoresekammer gegossen.

Abb. 8 Apparaturen für die elektrophoretische Auftrennung der
PLG-Phänotypen

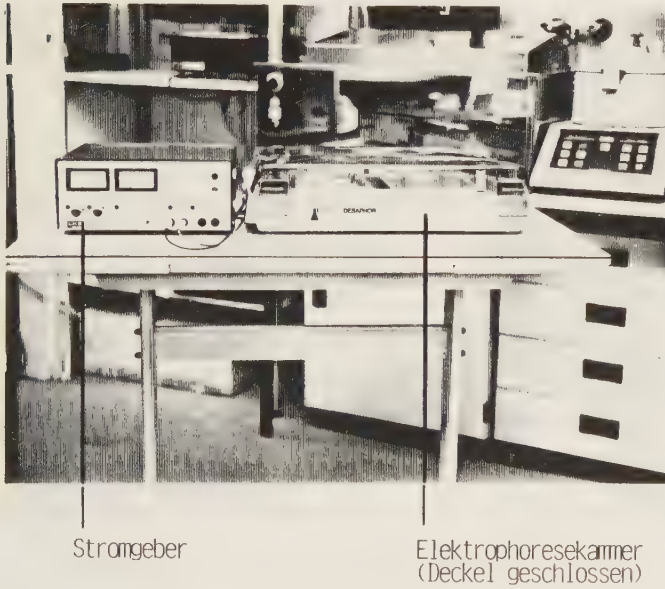
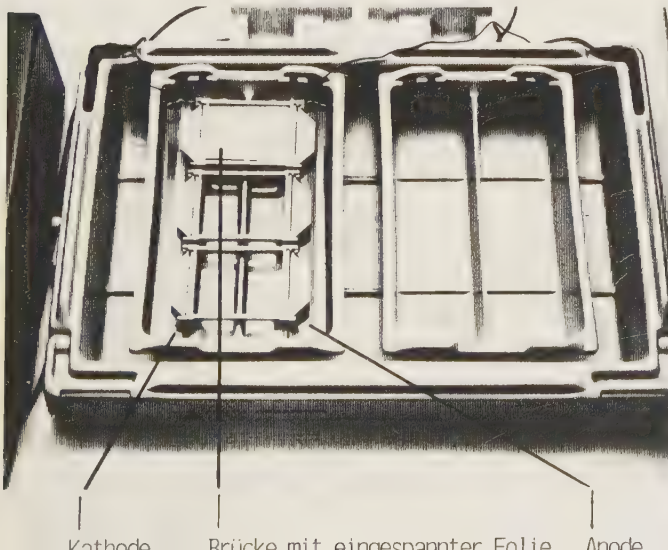


Abb. 9 Aufblick auf die Elektrophoresekammer (Deckel entfernt)



Die von uns verwendeten Kunststoffwannen haben einen Umfang von 20cm x 30cm, und es passen 2 davon in die Desaphor-Kammer. Jede Wanne ist in der Mitte durch eine Einlassung in 2 voneinander getrennte Kammern unterteilt, von denen jede ein Fassungsvermögen von ca. 800 ml hat. Jede Wanne faßt somit ca. 1600 ml Pufferlösung. An den 2 Enden jeder Wanne werden jeweils die Elektrodenstäbe (Anode und Kathode) in dafür vorgesehene Wandeinlassungen eingelegt, so daß beide Wannen separat für die Elektrophorese verwendet werden können (Abb. 9).

Da in jede Wanne 3 mit den Cellogelelstreifen bespannte Brücken eingelegt werden können, kann man in der Desaphorkammer mit 2 Wannen gleichzeitig auf 6 Folien die Elektrophorese durchführen. Das heißt: pro Elektrophorese können 48 Proben untersucht werden. Um verifizierbare Ergebnisse zu erhalten, trugen wir allerdings jede Probe zweimal auf. Außerdem wurde auf jeder Folie eine bekannte Referenz mit aufgetragen (in der Regel PLG 2-1). So konnten pro Elektrophorese in der Desaphorkammer 21 unbekannte Seren PLG-typisiert werden.

Da die Kammern nicht für die Art der verwendeten Brücken konzipiert sind, bietet nur die mittlere Wannentrennwand den Brücken eine Auflagefläche. Weil die Brücken dadurch nicht ausreichend stabil stehen, haben wir durch das Einklemmen von einfachen Glaspipetten zwischen den beiden Seitenwänden der Kammern eine die Brücken ausreichend abstützende Querverstrebung geschaffen.

Nach der Inkubation in der Pufferlösung werden die Folien beidseits mit Elektrophorese-Filterpapier abgetrocknet und so in die Brücken eingespannt, daß beide Enden der Folien etwa gleich lang über den vorderen und hinteren Brückenrand herabhängen (Abb. 10, 11). Dann werden mit dem 8-fach-Applikator pro Folie 8 Serumproben aufgestempelt (Abb. 12). Es empfiehlt sich,

Abb. 10 Auftragen der Serumproben auf die Eintauchfläche des
8-fach-Applikators

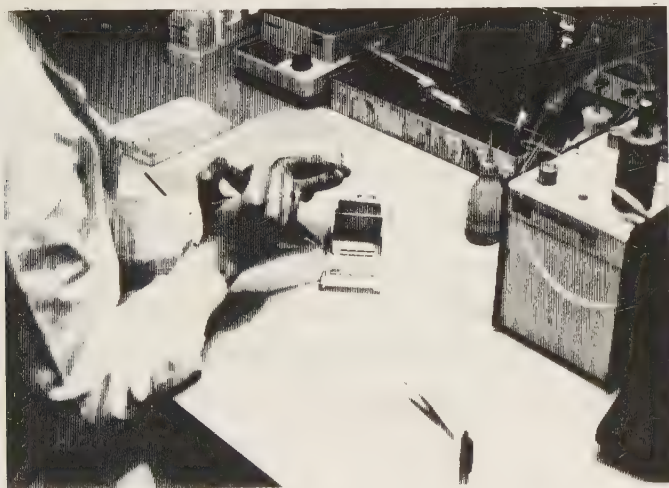
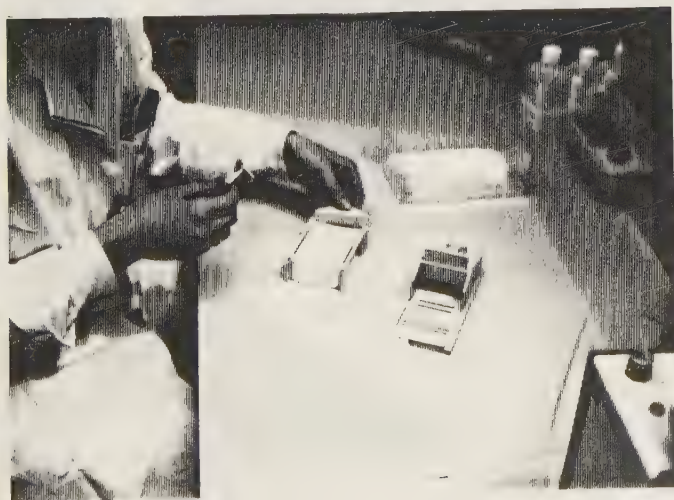


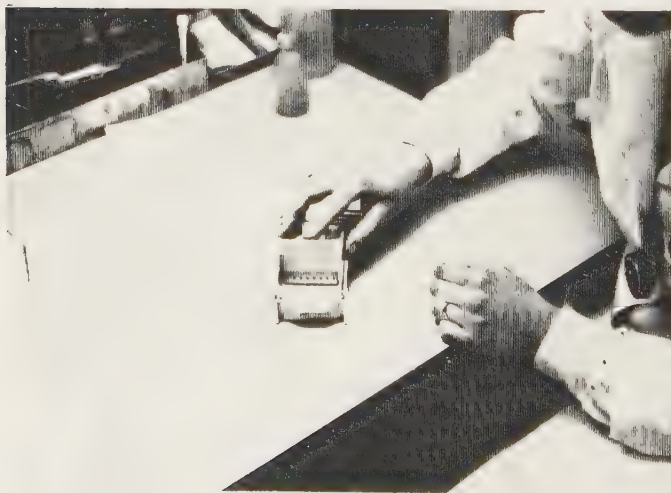
Abb. 11 Einspannen der Cellogefollie in die Brücke



die Stempel mehrmals hintereinander auf die Auftragstelle zu drücken, um von jeder Probe für eine Darstellung ausreichende Serummengen auf der Folie zu haben.

Anschließend werden die Brücken mit den Folien in die Wannen gestellt (Auftragsstellen im kathodalen Wannenteil), wobei darauf zu achten ist, daß die an beiden Enden der Brücken herunterhängenden Folienränder in die Pufferlösung eintauchen. Nach Schließung des Kammerdeckels erfolgt durch Einschaltung des Netzgerätes die Elektrophorese bei 320 V mit einer Dauer von 90 Minuten. Die angezeigte Spannung sollte sich zwischen 11 mA anfangs und maximal 20 mA am Ende der Elektrophorese bewegen, wenn alles regelgerecht durchgeführt wurde.

Abb. 12 Aufstempeln der Proben auf die eingespannten Folien mittels des 8-fach-Applikators



Nach der Elektrophorese werden die Folien ca. 3 cm von der Auftragsstelle entfernt mit ca. 20µl Anti-Human-Plasminogen-Antiserum bestrichen, wofür wir einfache Objektträger verwendeten. Nun folgt die Inkubation der Folien für 15 Minuten in der feuchten Kammer, wozu wir die Folien in der Elektrophoresekammer (bei geschlossenem Deckel) belassen. Danach werden die Folien ca. 20 - 30 Minuten in 0.9%iger Kochsalzlösung gewässert, um nicht gebundene Proteine und überschüssiges Serum zu entfernen. Anschließend werden die Folien ca. 10 Minuten in die Färbelösung und dann wiederum ca. 10 Minuten in den Entfärber gelegt. Die Ablesung kann jetzt erfolgen. Zur Aufbewahrung wurden die Folien in der Entfärbelösung belassen; für Demonstrations- und Transportzwecke wurden Fotografien von den interessierenden Folien angefertigt.

3. Ergebnisse

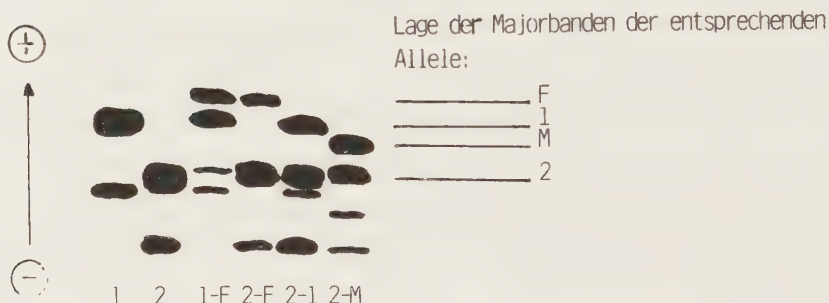
3.1. Darstellbarkeit der Phänotypen

Bei der Untersuchung der Seren mittels der Cellogel-Immunfixationselektrophorese konnten folgende PLG-Phänotypen beobachtet werden (Nomenklatur nach HUMMEL):

PLG 1, PLG 2 - 1, PLG 2, PLG 1 - F, PLG 2 - F, PLG 2 - M.

Abb. 13 zeigt eine skizzenhafte Darstellung der Bandenmuster. Wie die nachfolgende fotografische Wiedergabe (Abb. 14 u. 15) der verschiedenen Phänotypen zeigt, stellen sich in vielen Fällen die "Minorbanden" nur äußerst schwach dar, während die Majorbanden deutlich hervortreten und bei Betrachtung der Folien vor allem imponieren. Diese visuelle Reduzierung des Bandenmusters ermöglicht dem Betrachter eine rasche Orientierung

Abb. 13 Bandenmuster (Schema) der in dieser Untersuchung dargestellten PLG-Phänotypen



und eine schnelle, in der Regel eindeutige Zuordnung der Phänotypen.

Was die "Ausbeute" an ablesbaren und identifizierbaren Phänotypen angeht, so hatten wir eine Fehlerquote von etwa 1 auf 20 Proben, das heißt auf 3 Folien mit insgesamt 24 Darstellungen waren nur ein bis zwei Proben nicht ablesbar, was unseres Erachtens als gutes Ergebnis zu werten ist. Die Gründe dafür, daß manche Proben sich nicht oder nur unzulänglich darstellten, konnten zum Teil durch Veränderungen der Versuchsbedingungen aufgedeckt werden, zum Teil waren sie nicht der direkten Beobachtung zugänglich, sondern müssen vermutet werden:

Abb. 14 Fotografische Wiedergabe einer Cellogelefolie mit den darauf dargestellten PLG-Phänotypen

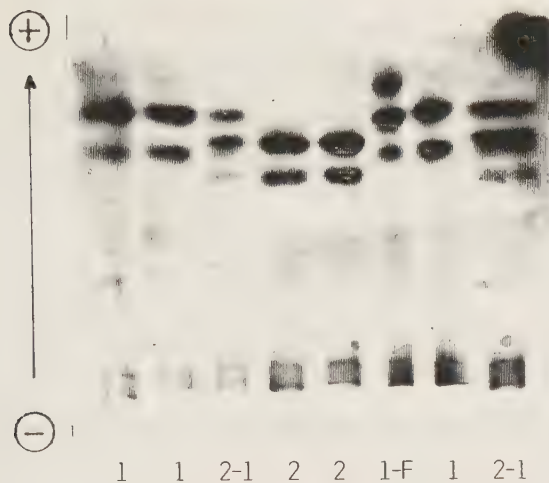
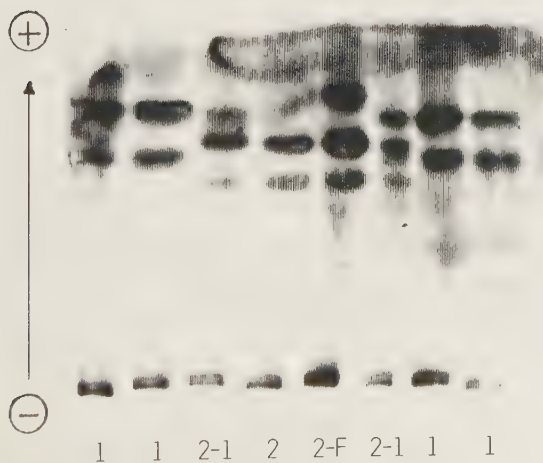


Abb. 15 Fotografische Wiedergabe einer Cellogelefolie mit den darauf dargestellten PLG-Phänotypen



3.1.1. Abhängigkeit der Darstellbarkeit von der Neuraminidasevorbehandlung

Als besonders wichtig für die gute Ablesbarkeit der PLG-Phänotypen hat sich die ausreichende Vorbehandlung der Seren mit Neuraminidase herausgestellt. Wie der Abb. 16 zu entnehmen ist, trägt das Glykoprotein Plasminogen am Ende des N-glykosidisch-gebundenen Kohlenhydratrestes N-Acetylneuraminsäure.

Die negativ geladene Neuraminsäure stellt, wenn sie nicht durch Neuraminidase abgespalten und verdaut wird, einen starken Störfaktor bei der elektrophoretischen Wanderung der Plasminogenmoleküle dar. Die nicht Neuraminidase-behandelten Plasminogenteilchen wandern durch die negative Ladung der Neuraminsäure im elektrischen Feld so schnell zur Anode, daß die typische Auftrennung in Bandenmuster nicht eintreten kann und eine Phänotypisierung unmöglich wird.

Nur wenn das gesamte Plasminogen der Probe vollständig von Neuraminsäure befreit ist, also in seiner desialisierten oder Asialo-Form vorliegt, stellt sich das einheitliche Bild von Major- und Minorbande dar. Erfolgte nur eine unzureichende Behandlung mit Neuraminidase, d.h. befinden sich in der Probe noch mehrere Plasminogenmoleküle, von denen nicht oder unzureichend die Neuraminsäure entfernt wurde, so entsteht durch die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten ein vollkommen unüberschaubares Bild von multiplen Banden. Hier ist zu bemerken, daß solche multiplen Bandenmuster durch Zufall gelegentlich Konfigurationen annehmen können, die täuschende Ähnlichkeit mit den Bandenkonstellationen von heterozygoten seltenen PLG-Phänotypen aufweisen!

Abb. 16 Position und Zusammensetzung der Kohlenhydrate im Plasminogen
(nach HEIMBURGER)

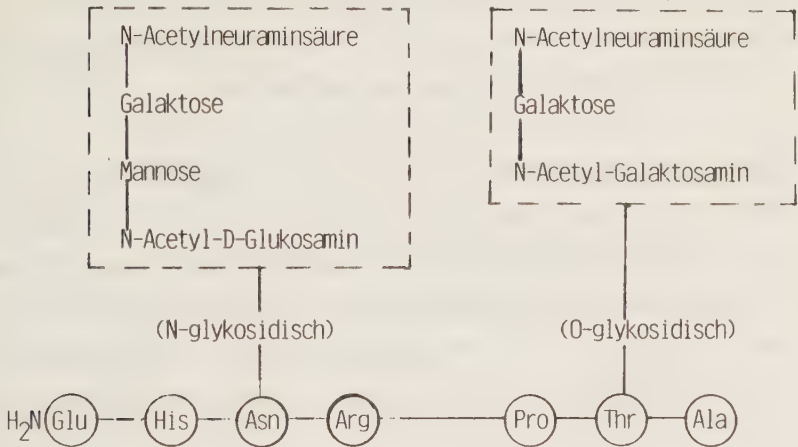


Abb. 17 Fotografische Wiedergabe der Bandenmuster von Proben, die unterschiedlich mit Neuraminidase vorbehandelt wurden.



Zu Beginn der Untersuchungen stellten sich öfters einzelne Proben in multiplen Banden dar, so daß eine Zuordnung zu bestimmten Phänotypen fast unmöglich war. Absichtliche Variationen bei der Neuraminidaseinkubation bewiesen eindeutig, daß das Auftreten von vielfachen Banden durch die unzureichende Neuraminidasevorbehandlung zustande gekommen war.

Abb. 17 zeigt einige Beispiele von Bandenmustern, die durch die unterschiedliche Neuraminidasebehandlung der Seren entstanden. Probe 1 wurde mit einer doppelten Verdünnung der Neuraminidaselösung (entsprechend also 500µl Lösung auf 10 units Neuraminidase Typ VIII), Probe 2 mit einer Lösung, die 400µl Lösung auf 10 Neuraminidaseeinheiten entsprach, angesetzt. In beiden Fällen können wegen der multiplen Banden keine Phänotypen identifiziert werden.

Probe 3 wurde mit einer Neuraminidaselösung angesetzt, die 300µl Lösung auf 10 Einheiten entsprach. Diese Verdünnung scheint einen Grenzwert darzustellen, bis zu dem noch eine volle Wirksamkeit der Neuraminidase möglich ist: Proben, die mit dieser Verdünnung behandelt wurden, konnten zum Teil gut, zum Teil schlecht dargestellt werden. Hier gaben wohl kleine Differenzen bei der Durchmischung von Neuraminidaselösung und Serum den Ausschlag.

Die Proben 6 und 8 wurden mit der Neuraminidase eines anderen Herstellers inkubiert. Die Verdünnung entsprach mit 250µl Lösung auf 1 mg der Lösung der Untersuchungsreihe. Leider konnten mit dieser Neuraminidase, die wesentlich preiswerter als die für die Untersuchung verwendete hochgereinigte Neuraminidase vom Typ VIII wäre, ebenfalls keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Einer ökonomischeren und damit kostensparenderen Handhabung der Neuraminidasebehandlung durch Verwendung von weniger

oder preiswerterer Neuraminidase sind also Grenzen gesetzt.

Neben der Zugabe einer ausreichenden Menge an hinreichend wirksamer Neuraminidase ist noch besonders auf eine genügend lange Inkubationsdauer zu achten. Versuche mit einigen Proben, die nur zwischen 3 bis 10 Stunden inkubiert worden waren, ergaben dieselben multiplen Bandenmuster wie sie sich als Ergebnis einer Inkubation mit zuwenig Neuraminidase darstellten. Untersuchungen mit etwa 12 Stunden inkubierten Seren erbrachten zwar überwiegend brauchbare Ergebnisse; im Lauf der Untersuchung aber kristallisierte sich immer deutlicher heraus, daß man die empfohlene Inkubationsdauer von 18 Stunden nicht um mehr als 3 bis 4 Stunden unterschreiten sollte.

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, versteht es sich von selbst, daß nur eine gute Vermischung von Serum und Neuraminidaselösung den Inkubationserfolg gewährleistet.

3.1.2. Andere Einflußfaktoren

Da jeweils mehr Seren gewonnen und eingefroren wurden als in einem Untersuchungsgang analysiert werden konnten, ergaben sich Unterschiede in der Lagerungsdauer bis zur endgültigen Untersuchung, die zwischen einem Tag und 2 Monaten lagen. Innerhalb dieses Aufbewahrungszeitraumes ließen sich jedoch keine Unterschiede in der Darstellbarkeit beobachten.

Über einen Alterungsversuch mit Seren, die ein Jahr lang im Gefrierschrank aufbewahrt wurden, wird an späterer Stelle dieser Arbeit noch einmal berichtet. Diese Untersuchung sollte überprüfen, wie groß der Abfall an

Plasminogenkonzentration und -aktivität bei den Seren nach so langer Aufbewahrungsdauer ist und ob nach diesem Zeitraum die PLG-Typisierbarkeit erschwert oder gar unmöglich ist.

Als Vorgriff auf die Ergebnisse dieser Untersuchung ist zu sagen, daß die Mitteilungen HUMMELS bestätigt werden konnten, "daß Seren hinsichtlich ihrer PLG-Typisierbarkeit über Jahre unbeeinträchtigt bleiben, sofern sie bei -20°C aufbewahrt bleiben. Lagert man sie hingegen im Kühlschrank (bei 4°C), so leidet - wie eigene Versuche zeigten - die Typisierbarkeit im Laufe der Zeit: von 24 Seren waren nach einem Monat Lagerung bei 4°C nur noch 18 typisierbar, nach 2 Monaten nur noch 13, nach 3 Monaten nur noch 9. Damit verhält sich PLG wie viele andere Blutbestandteile." (11)

Das heißt also, daß bei Lagerung der Seren in gefrorenem Zustand die Darstellbarkeit der typischen Bandenmuster lange Zeit erhalten bleibt. Lediglich die unsachgemäße Aufbewahrung der Proben (kein Einfrieren oder zu lange Lagerung in wieder aufgetautem Zustand) kann also zu Typisierungsschwierigkeiten etwa durch Abschwächung der Bandenmuster führen.

Eine solche Abschwächung der Banden kann freilich auch durch die Auftragung einer zu geringen Menge Serum bedingt sein. Kleine Verziehungen oder Verbiegungen an den Eintauch-Ösen der Stempel des 8-fach-Applikators oder ein ungleichmäßiges Niederdrücken des Applikatorhebels führen gelegentlich dazu, daß von manchen Proben nur eine geringe Menge oder fast gar kein Serum erfaßt und auf die Folie übertragen wird. Es ist daher anzuraten, die Stempel des Applikators mindestens 3mal abwechselnd in die Serumproben zu tauchen und auf die Folie zu überimpfen. Außerdem ist eine behutsame Behandlung, Säuberung und Aufbewahrung des Mikroapplikators und eine Inspektion der Stempelösen vor der Untersuchung unerlässlich.

Zu den - freilich schwer zu entdeckenden - Störgrößen der Folienelektrophorese gehören sicherlich auch Änderungen der Strom- und Spannungsverhältnisse während des Vorgangs der Elektrophorese. Sie zu erkennen würde die kontinuierliche Registrierung der elektrischen Vorgänge erfordern.

Trotz sorgsamer Einhaltung aller Versuchsbedingungen kommt es gelegentlich zu sogenannten Randeffekten, das heißt Verziehungen der dargestellten Banden zu einer Seite oder Verwischungen der Muster am Rand der Folien. Auch Verschmierungen im mittleren Bereich der Folie treten hin und wieder auf, so daß die entsprechenden Proben nicht ablesbar sind. Gelegentlich ist auch das "Zurückbleiben" einzelner, offensichtlich langsamer wandernder Proben zu verzeichnen, die sich deswegen nur insuffizient in die typischen Banden aufteilen.

Für all diese Effekte sind sicherlich im Einzelfall nicht unbedingt aufzudeckende Störfaktoren wie unbemerkter Spannungsabfall, Temperaturschwankungen (keine Kühlplatte), pH-Verschiebungen oder auch das Herabfallen von Tropfen vom Kammerdeckel auf die Folie verantwortlich.

Es bleibt aber zu bemerken, daß bei wirklich sorgfältiger Beachtung aller Regeln wie etwa

- sorgsames Einspannen der Folien
- gleichmäßige Einbringung der Brücken
- genaue Einstellung des Puffer-pH (pH-Meter-Eichung!)

der weitaus größte Teil der elektrophoretischen PLG-Auftrennung und -Darstellung gut verwertbare Ergebnisse brachte!

Wichtig für die ungestörte Ablesbarkeit der Bandenmuster ist auch das ausreichend lange Wässern (ca. 30 Minuten) der Folien in Kochsalzlösung. Zu kurzes Wässern reinigt die Folien nur unzureichend von überflüssigen Ei-

weißpartikeln, die dann bei der Färbung miterfaßt werden und den Blick auf Nuancen verstellen können. Nicht versäumt werden darf auf jeden Fall die regelmäßige Erneuerung des Färbekades, da mit zunehmender Probenmenge und Aufbewahrungsdauer die Färbekraft nachläßt.

3.2. Populationsgenetische Untersuchung

3.2.1. Verteilung der Phänotypen und Allelfrequenzen

Die Untersuchung von 484 Seren nichtverwandter Blutspender aus dem Raum Niederbayern/Oberpfalz ergab die in Tabelle 1 aufgeführten Häufigkeiten für die verschiedenen Plasminogenphänotypen.

Aus den beobachteten Werten wurden nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz die Erwartungswerte und die Allel- oder Genfrequenzen errechnet.

Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt, daß bei ungerichteter Partnerwahl die genetische Komposition einer Bevölkerung gleichbleiben muß. Es gilt freilich nur dann, wenn den betreffenden Erbmerkmalen kein Selektionsvorteil oder -nachteil zukommt und diese autosomal gesteuert (also nicht auf den Geschlechtschromosomen angelegt) sind (25).

Da der für das PLG-System angenommene autosomal-kodominante Erbgang nicht mehr zu bezweifeln ist, läßt sich folglich auch das Hardy-Weinberg-Gesetz darauf anwenden.

Die Formel für das Hardy-Weinberg-Gesetz lautet:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p und q stehen für die Frequenzen der Allele eines auf beiden Partnerchromosomen angelegten Genlocus.

Aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz lassen sich die Berechnungen der Genfrequenzen und der Erwartungswerte der Phänotypen ableiten:

Zur Errechnung der Genfrequenzen wird die prozentuale Häufigkeit der für das jeweilige Gen homozygoten Phänotypen durch Hundert geteilt. Dazu addiert man die prozentualen Häufigkeiten derjenigen heterozygoten Phänotypen, in denen das entsprechende Allel vertreten ist, geteilt durch 200.

Beispiel: Allele A, B, R

Phänotypen: AA, BB, RR (homozygot)

AB, AR, BR (heterozygot)

prozentuale Häufigkeit der Phänotypen: (AA), (BB) usw.

gesucht: Frequenz p von Allel A

Formel:
$$p = \frac{(AA)}{100} + \frac{(AB)}{200} + \frac{(AR)}{200}$$

In diesem Falle für Allel PLG*2:

$$p = \frac{9,3}{100} + \frac{41,53}{200} + \frac{1,24}{200}$$

$$p = 0,093 + 0,207 + 0,006$$

$$p = 0,306$$

Die Erwartungswerte für die verschiedenen Phänotypen werden folgendermaßen berechnet:

Die erwarteten Prozentzahlen für die homozygoten Phänotypen erhält man durch die Multiplikation des Quadrats der Genfrequenzen mit 100.

Formel: $p^2 \times 100$

Beispiel für PLG 2: Genfrequenz $PLG^*2 = 0.3068$

$$\begin{aligned} &\text{Erwartungswert (\%)} \text{ für Phänotyp PLG 2} = \\ &= (0.3068)^2 \times 100 = 9.42 \end{aligned}$$

Die Erwartungswerte für die heterozygoten Phänotypen erhält man durch die Multiplikation der beiden entsprechenden Genfrequenzen miteinander und mit 200.

Formel: $p \times q \times 2 \times 100$

Beispiel für PLG 2-1: Genfrequenz $PLG^*2 = 0.3068$

Genfrequenz $PLG^*1 = 0.6725$

$$\begin{aligned} &\text{Erwartungswert (\%)} \text{ für Phänotyp PLG 2-1} = \\ &= 0.3068 \times 0.6725 \times 2 \times 100 = 41.28 \end{aligned}$$

Die erwarteten Absolutzahlen ergeben sich schließlich durch den Bezug der Prozentzahlen auf die Gesamtmenge der untersuchten Personen.

Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, brachte diese Untersuchung eine äußerst gute Übereinstimmung der tatsächlich beobachteten Werte mit den erwarteten. Diese Einfügung in das Hardy-Weinberg-Äquilibrium bestätigt die korrekte Durchführung der Untersuchung und die angenommene Kodominanz des Erbgangs.

Tab. 1 Phänotypenhäufigkeit und Allelfrequenzen von Plasminogen in Niederbayern/Oberpfalz

PLG:	1	2-1	2	1-R*	2-R*	R-R	Total
Beobachtet (n)	218	201	45	14	6	0	484
Erwartet (n)	218.91	199.80	45.59	13.46	6.15	0.19	484
Beobachtet (%)	45.04	41.53	9.30	2.89	1.24	0	100
Erwartet (%)	45.23	41.28	9.42	2.78	1.27	0.04	100
Allelfrequenzen:							
	PLG*1 = 0.6725						
	PLG*2 = 0.3068						
	PLG*R = 0.0207						

* = seltene Allele (F, M, S)

3.2.2. Vergleich mit anderen Populationen aus dem westdeutschen Raum

Ein Vergleich der Häufigkeiten der PLG-Phänotypen und Allele mit den Ergebnissen anderer populationsgenetischer PLG-Untersuchungen im deutschen Raum ist den Tab. 2 und 3 zu entnehmen.

Beide zeigen die weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse dieser Studie mit den von anderen Untersuchern bei der westdeutschen Bevölkerung erhobenen Verteilungshäufigkeiten. Lediglich die von LATTKE und KRONE erhobenen Daten weichen in den Häufigkeiten der homozygoten Phänotypen PLG 1 und PLG 2 und der heterozygoten Formen 1 - R etwas ab, wozu freilich auch die geringere Anzahl von untersuchten Seren beigetragen haben kann.

Die Häufigkeit von 7.2% für die Typen PLG R - 1, die MAUFF 1981 in einem ebenfalls kleineren Kollektiv (222) fand, fällt auch etwas aus dem Rahmen. Diese relativ große Häufigkeit konnte in den nachfolgenden Untersuchungen nicht mehr bestätigt werden - auch nicht von MAUFF selbst, der im gleichen Jahr bei einem Kollektiv von 576 Personen aus dem Kölner Raum nur noch eine Häufigkeit von 3.5% für die unter PLG 1 - R subsummierten Phänotypen fand.

Etwas abweichende Ergebnisse veröffentlichte 1985 auch WEIDINGER, der für die Phänotypen PLG 1 die höchste Häufigkeit der westdeutschen Untersuchungen mit 50.89% beschrieb, während er für die seltenen Varianten 1 - R nur eine Häufigkeit von 0.83% fand, die deutlich unter den Zahlen der anderen deutschen Autoren - von LATTKE und KRONE abgesehen (1.4%) - liegt (35).

Tab. 2 Verteilung der PLG-Phänotypen (%) in verschiedenen Regionen Westdeutschlands

Autoren (Jahr)	Region	Methode*	n	PLG 1	PLG 2-1	PLG 2	PLG 1-R	PLG 2-R	PLG R-R
Mauff et al. (1981)	Westdeutsch- land	AGE IEF	222	47,75	36,94	7,21	7,20	0,9	0
Mauff et al. (1981)	Köln	AGE IEF	576	48,1	38,7	7,6	3,5	1,6	0,5
Jäger et al. (1983)	Südwest- deutschland	CE	527	45,92	39,09	9,11	4,17	1,71	0
Lattke/Krone	Ulm	CE	210	41,4	42,4	14,8	1,4	0	0
Osterhaus et al. (1983)	?	IEF	713	46,99	38,71	10,66	2,38	1,26	0
Weidinger et al. (1985)	Süddeutsch- land	IEF	957	50,89	40,86	7,32	0,83	0,10	0
Diese Untersuchung	Ostbavarn	CE	484	45,04	41,53	9,30	2,89	1,24	0

*AGE = Agargelelektrophorese IEF = Isoelektrofokussierung CE = Cellogelelektrophorese

Der tabellarische Überblick zeigt, daß die von uns gefundenen Häufigkeiten für die verschiedenen PLG-Phänotypen etwa eine arithmetische Mittel-lage zwischen den Zahlen der anderen westdeutschen Untersuchungen einnehmen und damit wohl ziemlich nahe an die für die westdeutsche Bevölkerung zu erwartenden Zahlen kommen dürften, die - grob gemittelt und aufgerundet - etwa folgendermaßen aussehen:

PLG 1 : ca. 45% (Variationen zwischen 41.4% und 47.75%)

PLG 2 - 1 : ca. 40% (36.9% bis 42.4%)

PLG 2 : ca. 9% (7.21% bis 14.8%)

PLG 1 - R : ca. 1-3% (1.4% bis 7.2%)

PLG 2 - R : ca. 1% (0 - 1.7%)

(PLG R - R bisher nur von MAUFF mit 0.5% gefunden)

Ein Vergleich der PLG-Genfrequenzen aus den vorliegenden westdeutschen Untersuchungen zeigt dasselbe Bild. Die Frequenz für PLG*1 liegt bei den meisten Autoren zwischen 0.67 und 0.69. Lediglich LATTKE und KRONE mit einer niedrigeren (0.633) und WEIDINGER mit einer höheren Frequenz (0.717) hatten andere Ergebnisse. Bei den PLG*2-Frequenzen weichen nur LATTKE und KRONE mit einer Frequenz von 0.36 stärker von den anderen Untersuchern ab, die zwischen 0.2 und 0.3 liegen. Bei den Genfrequenzen für PLG*R differieren ebenfalls WEIDINGER und LATTKE/KRONE mit niedrigeren Zahlen (0.007 und 0.005) gegenüber den restlichen Untersuchern (zwischen 0.018 und 0.04).

Tab. 3 PLG-Genfrequenzen in verschiedenen Regionen Westdeutschlands

Autoren (Jahr)	Region	n	PLG * 1	PLG * 2	PLG * R
Mauff et al. (1981)	Westdeutsch- land	222	0.6918	0.2778	0.0303
Mauff et al. (1981)	Köln	576	0.6982	0.2613	0.0405
Jäger et al. (1983)	Südwestdeutsch- land	527	0.6756	0.2950	0.0294
Lattke und Krone (1983)	Ulm	210	0.633	0.360	0.007
Osterhaus et al. (1983)	?	713	0.6753	0.3065	0.0182
Weidinger et al. (1985)	Süddeutsch- land	957	0.717	0.278	0.005
Diese Untersuchung	Ostbayern	484	0.6725	0.3068	0.0207

3.2.3. Vergleich mit nicht-deutschen Populationen

Ein Vergleich der von uns erarbeiteten PLG-Genfrequenzen mit den Ergebnissen nichtdeutscher Untersuchungen bei verschiedenen Rassen zeigt, daß unsere Zahlen sich gut in das international für Weiße (oder Kaukasoiden) errechnete Verteilungsmuster einfügen (Tab. 4). Die Untersuchungen von HOBART und RAUM und die neueren Arbeiten von DYKES, HUMMEL und auch von PASCALI und anderen zeigen bei Weißen Frequenzen von ca. 70% für das Gen PLG*1 (oder A) und von ca. 20% bis 30% für das Allel PLG*2 (oder B). Für die seltenen Allele werden allgemein Häufigkeiten von 1 - 3% bei den Weißen beschrieben (3,8,11,24).

Die Untersuchungen von HOBART an afrikanischen Negern aus Gambia und von RAUM an amerikanischen Negern und Orientalen lassen auf höhere Frequenzen des Gens PLG*1 (ca. 80%) und niedrigere Frequenzen für das Gen PLG*2 (ca. 15%) bei der negroiden Bevölkerung schließen - eine Tendenz, die sich in den Zahlen der von RAUM untersuchten Orientalen, bei denen das Allel PLG*1 mit einer Häufigkeit von 96% und das Allel PLG*2 mit einer Frequenz von 3% auftritt, noch verstärkt (7, 27).

Während die Anzahl von seltenen Allelen bei den 3 Grundrassen - kaukasoiden, negroiden und mongoliden - etwa gleich hoch ist, zeichnet sich bei den Zahlen für das Gen PLG*1 ein Anstieg und für das Gen PLG*2 ein Gefälle in der Reihenfolge Weiße - Negroiden - Mongolide ab, was MAUFF zu der Feststellung veranlaßte: "In Negroid populations PLG seems to be less and in Orientals least polymorphic" (17). SPIELMANN und KÜHNLE gelangten deswegen auch zur Auffassung, daß "bei Mongoliden und Negroiden das PLG-System weit weniger informativ" sei (32).

Tab. 4 PLG-Genfrequenzen bei nicht-deutschen Populationen

Population (Autoren)	n	PLG * 1(A)	PLG * 2(B)	PLG * R
Engländer, Weiße	327	0.71	0.29	0
Gambier, Schwarze	89	0.86	0.14	0
Hobart (1979)				
USA, Weiße	102	0.69	0.30	0.01
USA, Orientalen	69	0.96	0.03	0.01
USA, Schwarze	127	0.80	0.18	0.02
Raum (1980)				
USA, Weiße	3240	0.676	0.294	0.03
USA, Schwarze	368	0.727	0.227	0.046
USA, Mexikoamerikaner	295	0.854	0.143	0.003
USA, Indianer	100	0.860	0.125	0.015
Dykes (1983)				
Mexikaner, Oberschicht	123	0.857	0.110	0.033
Mexikaner, Unterschicht	927	0.870	0.126	0.004
Hume1 (1983)				
Südtaliener, Weiße	287	0.7656	0.2136	0.0208
Pascali (1984)				
Südafrikanische Neger	807	0.6908	0.2931	0.0161
Skoda (1984)				

Die Untersuchungen von DYKES et al. an amerikanischen Weißen, Schwarzen, Mexikanern und Indianern stimmen mit der von HOBART und RAUM herausgearbeiteten Tendenz überein, wobei die Genfrequenzen bei den Indianern auf deren asiatischen Ursprung und die Frequenzen bei den Mexikanern auf deren sowohl mongolide als auch negride Blutanteile zurückzuführen sind (3).

HUMMELS Ergebnisse bei Mexikanern gehen mit denen von DYKES konform und werden von ihm ebenfalls mit der Durchmischung von europidem, negridem und vor allem mongolidem (indianischer Ursprung!) Blut interpretiert (8).

Der Vollständigkeit halber muß erwähnt werden, daß - wie ebenfalls der Tabelle zu entnehmen ist - 1984 SKODA, MAUFF et al. die Ergebnisse ihrer PLG-Untersuchung bei südafrikanischen Bantus vorstellten, welche überraschender Weise - und im Gegensatz zu allen bisherigen Untersuchungen bei Negern - ähnliche PLG-Frequenzen aufwiesen, wie sie nur weiße Bevölkerungsgruppen zeigten. Wie dieser überraschende Befund einzuordnen ist, steht noch offen (30).

3.3. Familienuntersuchung

Die populationsgenetische Untersuchung aus dem ostbayerischen Raum erbrachte für die Phanotypen 1 - R eine Häufigkeit von 2.89% und für die Typen 2 - R einen Wert von 1.24%. Die 14 unter 1 - R subsumierten PLG-Phanotypen waren ausnahmslos dem Typ 1 - F (neuere Bezeichnung nach MAUFF 1 - A1) zuzuordnen.

Um zu bestätigen, daß es sich bei den relativ seltenen Allelen F tatsächlich um ein vererbbares Merkmal handelt, und um auszuschließen, daß eventuell (z.B. wegen ungenügender Neuraminidasebehandlung!) aufgetretene Artefakte die Existenz einer F-Bande vortauschten, wurde versucht, mittels einer

Familienuntersuchung die Vererbung dieses F-Allels nachzuweisen.

Dies gelang auch bei der nachstehend beschriebenen Familie, wo wir die Existenz des Allels PLG*F über 3 Generationen hinweg verfolgen konnten (Abb. 18):

Ausgangspunkt der Untersuchung war die Blutspenderin Rosa B., deren Serum im Rahmen der populationsgenetischen Studie als Phänotyp PLG 1 - F typisiert wurde. Die Mutter von Frau B. war zwar verstorben, aber der Vater Ludwig H. konnte untersucht werden und wies ebenfalls den Phänotyp 1 - F auf. Von den beiden Schwestern von Frau B. wies die eine, Maria S. ebenfalls den heterozygoten Phänotyp PLG 1 - F auf, die andere den homozygoten PLG 1 - 1. Der Sohn Christian von Frau B. hat das Merkmal F nicht vererbt bekommen, er besitzt den Phänotypen 2 - 1. Die Untersuchung der 3 Töchter von Maria S. erbrachte jedoch, daß alle 3 den Phänotypen 1 - F besitzen, und dieser somit in die 3. Generation vererbt worden ist. Ein Artefakt ist somit ausgeschlossen, der autosomal-kodominante Erbgang bestätigt (Abb. 19 u. 20).

Abb. 18 PLG-Stammbaum der Blutspenderin Rosa B.

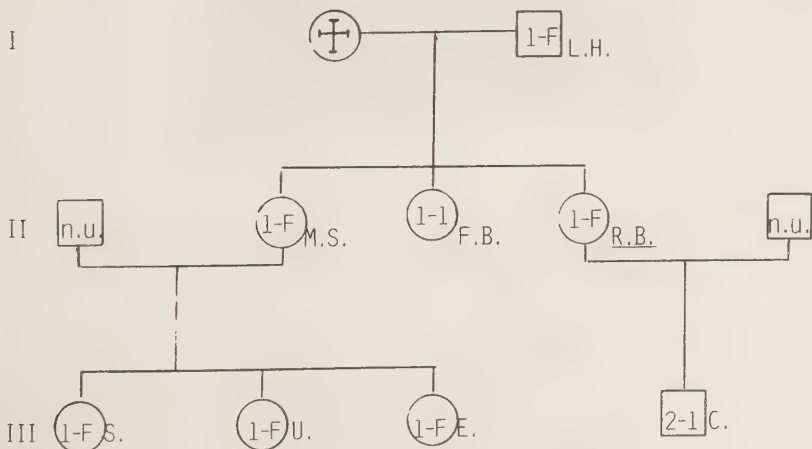


Abb. 19 Fotografische Wiedergabe der auf Cellogelfolie dargestellten PLG-Phänotypen der Familienuntersuchung (Teil 1)

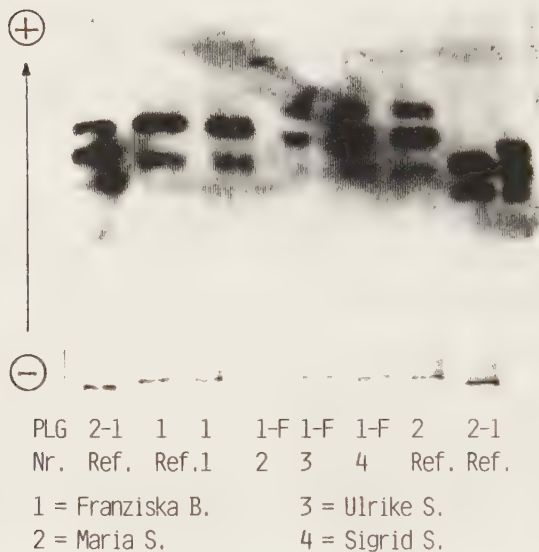
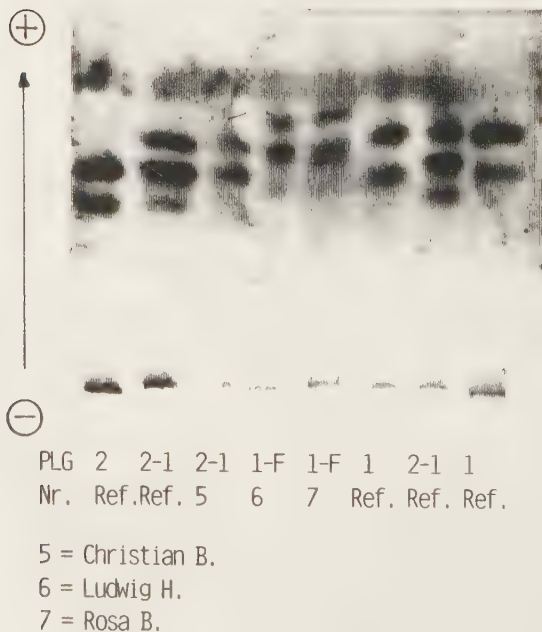


Abb. 20 Fotografische Wiedergabe der auf Cellogelfolie dargestellten PLG-Phänotypen der Familienuntersuchung (Teil 2)



3.4. Anwendung in der Paternitätsbegutachtung

290 Seren (bei -20°C mehrere Monate bis max. ein halbes Jahr im Gefrierschrank gelagert) aus abgeschlossenen Vaterschaftsgutachtenfällen wurden ebenfalls PLG-phänotypisiert und die Ergebnisse wurden unter 2 Aspekten retrospektiv gewertet:

Material aus Gutachten, die den statistischen Nachweis einer Vaterschaft erbracht hatten (Vaterschaft "sehr wahrscheinlich" bzw. "praktisch erwiesen") wurde zur Untersuchung der familiären PLG-Phänotypen-Verteilung, also für eine Vater-Mutter-Kind-Studie verwendet.

Seren aus Paternitätsuntersuchungen, die mit einem Vaterschaftsausschluß für die untersuchte Person geendet hatten, wurden daraufhin untersucht, ob sich auch im PLG-System ein Ausschluß ergeben hätte.

3.4.1. Eltern-Kind-Untersuchungen

51 "Gutachten-Familien" wurden mittels der Cellogelelektrophorese PLG-typisiert. Die Untersuchung der entsprechenden 153 Seren erbrachte das in der Tab. 5 aufgeführte Ergebnis, die den Phänotypen-Kombinationen der statistisch gesicherten Eltern den resultierenden Phänotyp des Kindes gegenüberstellt.

Ein Abweichen von dem - freilich inzwischen nicht mehr bezweifelten - autosomal-kodominanten Erbgang wurde in keinem Fall festgestellt.

Tab. 5 Eltern-Kind-Kombinationen der PLG-Phänotypen bei 51 Familien

Elternkombination	n	PLG-Phänotypen der Kinder (n)				
		1	2-1	2	1-R	2-R
1 x 1	13	13				
1 x 2-1	17	7	10			
1 x 2	7		7			
1 x 1-R	2	2				
1 x 2-R	1				1	
2-1 x 2-1	8	2	6			
2-1 x 2	3		2	1		
Total	51	24	25	1	1	

Tab. 6 Vaterschaftsausschlüsse mit und ohne PLG-System

Ausschluß im PLG-System		Kein Ausschluß im PLG-System	
Systeme (n)	Ausschlüsse (n)	Systeme (n)	Ausschlüsse (n)
nur PLG	0	1	3
PLG + 1	1	2	11
+ 2	2	3	9
+ 3	1	4	7
+ 4	3	5	5
+ 5	1	6	7
+ 6	1	8	2
+10	1	9	1
Total	10		45

3.4.2. Vaterschaftsausschlüsse unter Einbeziehung des PLG-Systems

Material aus Vaterschaftsgutachten, die den Ausschluß einer Vaterschaft ergeben hatten, wurde gesichtet und daraus wurden 55 Seren von als Vätern ausgeschlossenen Beteiligten (Kläger, Beklagte, Zeugen) ausgewählt. Diese Seren und jeweils 41 Seren (die Anzahl ist kleiner, da in manchen Fällen mehrere Personen ausgeschlossen werden konnten) sowohl der beteiligten Mütter als auch der Kinder wurden ebenfalls PLG-typisiert.

Folgende Systeme bzw. Blutgruppenmerkmale waren zur Paternitätsbegutachtung untersucht worden: ABO, Rhesus, Kell, Colton (b), Lutheran, P, C^W, MN, Ss, Duffy, Kidd, Haptoglobin (Hp), Gm - System, Km (Inv) - System, Gruppenspezifische Komponente (Gc), Saure Erythrozytenphosphatase (SEP), Phosphoglucomutase (PGM), Adenylatkinase (AK), Adenosindesaminase (ADA), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGD), Esterase D (EsD), Glyoxalase (GLO), Komplementkomponente 3 (C 3), Properdinfaktor B (Bf), Transferrin (Tf), α_1 -Antitrypsin (Pi) und bei Bedarf HLA.

Es sollte überprüft werden, in wieviel Ausschlußfällen sich auch Ausschlüsse im PLG-System ergeben hätten.

Tab. 6 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. In 45 der 55 Ausschlußfälle war zwar kein zusätzlicher Ausschluß im PLG-System möglich; in den restlichen 10 Fällen (18%) wäre jedoch auch im PLG-System ein Vaterschaftsausschluß möglich gewesen.

Angeichts der großen Zahl der hier verwendeten Systeme scheint uns diese "Erfolgsquote" eines einzelnen Systems recht vielversprechend für den Einsatz der PLG-Typisierung bei der Vaterschaftsbegutachtung zu sein. Freilich ist der Nutzen des PLG-Systems bei der Paternitätsbegutachtung ohne-

hin nicht mehr bestritten. MAUFF errechnete für das PLG-System eine isolierte theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit von 20,4%, so daß es damit die meisten der neuerdings beschriebenen polymorphen Protein-Systeme übertreffe ("In this respect PLG surpasses most of the recently described polymorphic protein systems") (18).

SPIELMANN und KUHNL verglichen einige der "jüngeren" Systeme miteinander, indem sie synoptisch zusammenstellten, inwieweit diese wichtige Voraussetzungen für die Einführung in die Abstammungsbegutachtung erfüllten (siehe Tab. 7) (32). Auch daraus geht hervor, daß sich das PLG-System für die Anwendung bei der Vaterschaftsbegutachtung hervorragend eignet, was auch Weidinger bestätigte, der das PLG-System als wertvoll für die Vaterschaftsbegutachtung bezeichnete: "The PLG system, therefore, appears to be a usefull genetic marker, not only for population studies, but also for paternity testing." (35).

Tab. 7 Wichtige Voraussetzungen für die Einführung von Systemen in die Abstammungsbegutachtung (nach SPIELMANN und KÜHL)

Systeme						Voraussetzungen
Fakt. XIIIa	Fakt. XIIIb	PLG	AMY 2	GDH	GAA	
+	+	+	+	+	+	Nachweis spezifischer Aktivität
-	-	(+)	+	+	-	Untersuchung des gereinigten Proteins
+	+	(+)	+	+	+	Vergleich mit anderen Techniken
+	+	+	+	+	+	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorhanden
(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	Familienuntersuchungen
+	+	(+)	+	+	(+)	Polymorphismus bei Kleinkindern nachweisbar
+	+	+	+	+	+	Individuelle Reproduzierbarkeit
(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	Lagerungsstabilität
-	-	-	-	-	-	Modifizierende Gene bekannt
+	+	+	(+)	+	+	Hoher Informationswert
+	-	-	-	-	-	Stumme Gene / quantit. Varianten bekannt
(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	Formalgenetik gesichert
+	+	+	+	+	(+)	Praktikabilität

+ = Voraussetzung erfüllt (+) = teilweise erfüllt - = nicht erfüllt

D QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PLASMINOGEN

1. Einleitung

Für die quantitative Bestimmung von Plasminogen, also die Messung des Plasminogengehalts als Maß für die fibrinolytische Aktivität des Plasmas, existieren inzwischen mehrere Labormethoden (33). Die wohl am längsten bekannte Methode ist die Plasminogen-Bestimmung mittels der radialen Immundiffusion, auf die später genauer eingegangen wird.

Ebenfalls seit einiger Zeit in der Anwendung und bewahrt ist die Koagulometermethode nach JAKOBI, KARGES und HEIMBURGER (12). Dieser Test verbindet praktisch den clot-lysis-Test, der globale Hinweise auf das Funktionieren der Fibrinolyse gibt, mit der Thrombinzeitmessung, die die letzte Phase der Gerinnung erfaßt: Das Plasminogen in der Probe wird durch Zugabe eines überschusses von Streptokinase in einen Aktivatorkomplex (PLG-Sk) umgewandelt und mit plasminogenhaltigem Rinderfibrinogen inkubiert. Der Aktivator führt das Rinderplasminogen in Plasmin über, welches seine fibrinogenolytische Wirksamkeit entfaltet. Nach der Inkubation wird die Gerinnungszeit mit dem Koagulometer nach SCHNITKER und GROSS gemessen. Je stärker die Fibrinogenolyse induziert wurde, das heißt je größer der Plasminogengehalt im untersuchten Plasma war, desto länger ist die Gerinnungszeit. Mittels der Verdünnungsreihe eines Normalplasmapools kann eine Eichkurve angelegt und über die Gerinnungszeit auf den Plasminogengehalt in % der Norm umgerechnet werden.

Eine wesentliche Weiterentwicklung der Plasminogenbestimmung stellt die chromogene Substratmethode, also die Messung der Plasminogenkonzentration

mittels eines photometrischen Farbtests dar. Auch auf diese Methode wird an späterer Stelle eingegangen.

Ein ähnliches Prinzip, nämlich die Reaktion des zu untersuchenden Plasminogens mit einem synthetischen Substrat, liegt auch der fluorimetrischen Methode zugrunde (31): Das zu untersuchende Plasma wird mit Streptokinase im überschuß inkubiert, so daß sich das gesamte Plasminogen mit der Streptokinase zu dem bereits mehrfach erwähnten Aktivatorkomplex verbindet. Dieser Komplex hat die Fähigkeit, andere Plasminogen-Moleküle zu aktivieren, das heißt als Aktivator zu fungieren. Statt des natürlichen Substrates wird zu diesem Aktivatorkomplex nun aber ein synthetisches Plasmin(ogen)-substrat gegeben, dessen Aminosäuresequenz dem Teil des natürlichen Substrates, an dem die aktivierende Spaltung eintritt, nachgebildet ist. Das Plasmin(ogen)-substrat, das bei der fluorimetrischen Plasminogenmessung mit dem Protopathsystem (AHS) verwendet wird, hat die Sequenz: D-Valin-Leucin-Lysin-5-Amidoisophtalinsäure-Dimethylester, (H-D-Val-Leu-Lys-AIE). An dieser täuschend ähnlichen Imitation entfaltet nun der Aktivatorkomplex seine natürliche proteolytische Aktivität und spaltet davon AIE ab, welches fluorimetrisch gemessen werden kann. Das nachfolgende Schema verdeutlicht den Reaktionsablauf nochmals:

Plasminogen Streptokinase → Plg - Sk - Komplex
(Probe)

Val-Leu-Lys-AIE Plg - Sk - Komplex → Val-Leu-Lys + AIE ↙
fluorimetrische Messung!

Nur marginal erwähnt sei noch die Plasminogenbestimmung mit der Elektromunddiffusion nach LAURELL, der sogenannten Raketentechnik. Von dieser

doch recht großen Auswahl quantitativer PLG-Bestimmungsmethoden haben wir uns für die Immundiffusionsmethode auf Partigenplatten und für den photometrischen Farbstest entschieden. Der Grund, die Immundiffusion auf Partigenplatten zu wählen, lag in erster Linie darin, daß uns diese Untersuchung die Feststellung des absoluten Plasminogengehalts in Milligramm pro Deziliter auf immunologischer Basis ermöglicht, was als ergänzende Untersuchung zu der ebenfalls immunologischen PLG-Phänotypendarstellung sinnvoll erschien. Für den Farbstest entschied der Umstand, daß das dafür benötigte Photometer bereits vorhanden war und ohne große Veränderungen zu dieser - außerhalb der sonst damit durchgeführten enzymatischen Routinemessungen liegenden - Untersuchung verwendet werden konnte.

2. Aufgabenstellung

Hauptziel dieser quantitativen Bestimmungen von Plasminogen war es, die Plasminogenkonzentrationen der PLG-typisierten Proben in Beziehung zu deren PLG-Phänotypen zu setzen. Hinweise auf mögliche Korrelationen waren den Arbeiten von SACHS entnommen, der 1984 bei den Plasmen seines Typs III eine geringere fibrinolytische Aktivität gemessen hatte. Er stellte die Überlegung an, ob den von ihm differenzierten Gruppen "neben dem genetischen Interesse auch eine klinische Bedeutung zukommen" könnte (28).

NAKAMURA und ABE berichteten ebenfalls 1984, daß eine von ihnen beobachtete PLG-Allel-Variante (PLGN*MJ) mit einer geringeren oder überhaupt nicht vorhandenen Plasminogenaktivität verbunden war (21).

Unsere Studie sollte deswegen untersuchen, ob sich faßbare Unterschiede in

der Plasminogenkonzentration der nach PLG-Phänotypen eingeordneten Seren ergeben. Besonders sollte festgestellt werden, ob sich die Seren oder Plasmen der seltenen PLG-Phänotypen durch einen Mindergehalt oder eine Minderaktivität an Plasminogen von denen der häufigen Phänotypen unterscheiden. Weiterhin sollte anhand des Kollektivs der untersuchten Blutspender überprüft werden, ob für verschiedene Lebensaltersstufen unterschiedliche Plasminogendurchschnittskonzentrationen zu belegen seien, was möglicherweise auch Hinweise auf eine Erhöhung oder Verminderung der Thromboseneigung in bestimmten Altersgruppen geben könnte. Ein Vergleich des Plasminogengehalts der weiblichen und der männlichen Untersuchungspersonen wurde ebenfalls vorgenommen, um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede herauszuarbeiten.

In einem sogenannten Alterungsversuch sollte schließlich überprüft werden, ob die Länge der Lagerung Einfluß auf den Plasminogengehalt und damit eventuell auf die Phänotypen-Darstellbarkeit haben könnte. Eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der quantitativen und qualitativen Bestimmungsergebnisse sollte überdies durch die ein halbes Jahr später stattfindende nochmalige Messung von frischen Blutproben einer Reihe derselben Probanden ermöglicht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Messung des Plasminogengehalts mittels Immundiffusion auf Partigenplatten

3.1.1. Probengewinnung

Für die Untersuchung mit den Partigenplatten wurden dieselben Seren verwendet, die auch mit der Cellogelelmethode typisiert worden waren. Allerdings wurden die Proben nicht tiefgefroren, sondern alle in vergleichsweise frischem Zustand (nicht länger als 15 - 20 Stunden im Kühlschrank gelagert) untersucht.

3.1.2. Material

- M-Partigen-Plasminogen (=M-Partigen-Immundiffusionsplatten für Plasminogenbestimmung (Behring))
- Referenz: Protein-Standard-Plasma human (Behring)
- Kontrollplasma human für Partigen (Behring)
- Partigen - Dispenser 5 µl (Behring)
- Partigen - Meßlineal
- Aqua dest., physiologische Kochsalzlösung

3.1.3. Methode

3.1.3.1. Testprinzip

Die radiale Immundiffusion erfolgt auf Platten, die mit einem Gel beschichtet sind, welches die dem zu bestimmenden Antigen (in diesem Falle Human-

Plasminogen) entsprechenden Antikörper (hier Anti-Human-Plasminogen) enthält. Das zu untersuchende Plasma wird in kreisrunde Auftragslöcher im Gel gegeben, diffundiert radial in das Gel und bildet mit den im Gel enthaltenen Antikörpern Immunkomplexe.

Die Immunkomplexe sind nahe an der Auftragsstelle zunächst löslich, formieren sich aber in weiterer Distanz zu größeren, unlösbaren Komplexen. Der schärfste Präzipitatsradius stellt den äußersten Rand des im Idealfalle kreisrunden Präzipitats dar und kennzeichnet das Erreichen des Äquivalenzpunktes und damit das Ende der Diffusion mit vollständiger Präzipitation. Die Konzentration des gesuchten Antigens ist proportional dem quadrierten Präzipitatsdurchmesser. Mittels der radialen Immundiffusion auf antikörperhaltigen Partigenplatten läßt sich also der immunologisch nachweisbare Gehalt an Plasminogen erfassen.

3.1.3.2. Durchführung

Vom Referenzplasma (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4), vom Kontrollplasma (1 : 2) und von den zu untersuchenden Proben (1 : 2) werden mit 0.9%iger Kochsalzlösung Verdünnungen angesetzt.

Danach werden mit dem feinkalibrigen Partigendispenser jeweils 5 µl dieser Verdünnungen in die Auftragslöcher der Partigenplatten gefüllt, wobei darauf zu achten ist, daß die Agarschicht nicht verletzt wird. Wird beim Beschicken der Platte das Gel lädiert, so stellen sich nach Beendigung der Immundiffusion keine kreisrunden Präzipitate, sondern nicht verwertbare Ovale dar.

Jede Partigenplatte besitzt 12 Auftragslöcher. Wird eine größere Menge an Proben - wie bei dieser Studie - untersucht, so reicht es - vorausgesetzt, es werden die gleichen Chargen der Platten verwendet -, nur bei einer Platte 3 Auftragsstellen mit den Verdünnungen der Referenz und eine Auftragsstelle mit der Kontrolle zu belegen, wodurch auf einer Platte nur 4 Auftragsstellen für die Proben übrig bleiben. Bei den weiteren Untersuchungsläufen mit der gleichen Charge genügt es dann, pro Platte ein Loch mit Kontrollserum zur Richtigkeitskontrolle zu füllen, so daß mit einer Partigen-Platte 7 Proben untersucht werden können.

Die Platten werden nach der Beschickung ca. 50 Stunden mit geschlossenem Deckel bei Raumtemperatur gelagert. Wenn man die Bildung von Kondenswasser beobachtet, so sollte man die Platte mit der Oberseite nach unten lagern, so daß das Kondenswasser nicht vom Deckel auf den Agar oder in die Auftragslöcher tropft.

Nach 50 Stunden ist der Endpunkt der Diffusion erreicht. Jetzt können die Durchmesser der runden Präzipitate mit den Partigenlineal, das an die Unterseite der Platten angelegt wird, ausgemessen werden. Zum Erstellen der Bezugskurve werden die quadrierten Durchmesser (D^2) der Präzipitate der Referenzverdünnungen auf Millimeterpapier als Funktion der Konzentration aufgetragen (Ordinate : Quadrate der Ringdurchmesser in mm^2 ; Abszisse: Plasminogenkonzentration in mg/dl). über diese Bezugskurve können nun die den quadrierten Durchmessern der Proben-Präzipitate entsprechenden Plasminogen-Konzentrationen ermittelt werden, die wegen der 1 : 2-Verdünnung noch mit 2 multipliziert werden müssen.

3.2. Messung der Plasminogenkonzentration und -aktivität mit dem photometrischen Farbtest

3.2.1. Probengewinnung

Von 264 der 484 mittels PLG-Typisierung und radialer Immundiffusion untersuchten Blutspender wurden im Rahmen der Blutspende Zitratplasmen gewonnen. Dafür wurden 9 Teile frisch entnommenes Blut mit einem Teil Natriumzitrat vermischt. Innerhalb 10 - 12 Stunden wurde das Blut zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und entweder sofort untersucht oder bei ca. -20°C tiefgefroren. Die tiefgefrorenen Seren wurden nicht länger als 2 - 3 Wochen gelagert und dann ca. 15 Minuten vor der Bestimmung aufgetaut und nochmals durchmischt.

3.2.2. Material

3.2.2.1. Geräte

An Geräten sind für diese Untersuchung lediglich laborübliche Pipettenhalter und -spitzen sowie ein Photometer nötig. Wir verwendeten das Photometergerät 1101 M von Eppendorf (Wellenlänge Hg 405 nm; Küvetten: 1 cm Schichtdicke; Meßtemperatur 25°C).

3.2.2.2. Reagenzien

Der von der Firma Boehringer/Mannheim angebotene und für diese Untersuchung verwendete Testkit enthält folgende Reagenzien:

- Pufferkonzentrat (Tris/Imidazol); Ionenstärke = 0,2; pH 7,4
- Streptokinase 10 000 Einheiten/Flasche
- Chromozym PL (Tos-Gly-Pro-Lys-pNA) 10 μ mol /Flasche)

zusätzlich erforderlich sind

- Natriumzitat (0.11 mol/l)
- Essigsäure 20%
- destilliertes Wasser

3.2.3. Methode

3.2.3.1. Testprinzip

Das Prinzip der photometrischen Plasminogenbestimmung verhält sich analog zu der fluorimetrischen Methode, die an anderer Stelle bereits vorgestellt wurde:

Plasminogen verbindet sich mit Streptokinase zu einem Aktivatorkomplex (PLG-Sk). Diesem Aktivatorkomplex, der in der Lage ist, Plasminogen in die aktive, fibrinolytische Form Plasmin überzuführen, wird statt des natürlichen Substrates Plasminogen ein synthetisches Substrat angeboten.

Von diesem Tos-Gly-Pro-Lys-p-Nitro-Anilin spaltet der Aktivatorkomplex p-Nitro-Anilin ab, dessen Konzentration indirekt über eine Extinktionsänderung photometrisch bestimmt werden kann. Da die Konzentration des Endproduktes der Menge an aktivierbarem Plasminogen entspricht, kann also über die Bestimmung der Extinktionsänderung $\Delta E (=E_{\text{Probe}} - E_{\text{Leerwert}})$

und durch den Bezug von ΔE der Proben auf eine mittels eines Normalplasma-pools erstellte Bezugskurve die Plasminogenkonzentration in % der Norm abgeleitet werden.

Somit läßt sich durch den photometrischen Plasminogen-Farbstest die Konzentration des aktivierbaren Plasminogens in Prozent der Norm ermitteln.

Dieser funktionelle Test gibt Aufschluß sowohl über die Aktivierbarkeit bzw. Aktivität des in der Probe enthaltenen Plasminogens als auch - in-takte Aktivität vorausgesetzt - über den Gehalt an Plasminogen.

2.3.2. Durchführung

Der Farbstest ist als Zweipunktmessung und als kinetische Messung durchzuführen. Wir wendeten die 2-Punkt-Methode an:

Gemäß den Angaben des Herstellers wird durch Zugabe von Pufferlösung 1 zur Streptokinase die Streptokinase-Puffer-Lösung 2 hergestellt. Lösung 3 entsteht durch Auflösen des Chromozym PL in destilliertem Wasser. Dann wird entsprechend dem nachfolgenden Schema in Küvetten pipettiert (RL=Reagenzien-leerwert) und gemessen (Meßtemperatur 25° C):

In Küvetten pipettieren:

	RL	Probe
Puffer	0,1 ml	-
verdünntes Plasma	-	0,1 ml
*Lösung 2	0,2 ml	0,2 ml

Mischen und 5 Minuten bei Meßtemperatur inkubieren.

* im Zeittakt (z.B. 10 sec.) pipettieren

	RL	Probe
Lösung 3	0,2 ml	0,2 ml
Sofort mischen und 3 Minuten bei Meßtemperatur inkubieren.		
Essigsäure (20%)	1 ml	1 ml
Sofort mischen und innerhalb von 60 Minuten Extinktionen E_{RL} und E_{Probe} messen.		

$$E_{Probe} - E_{RL} = \Delta E_{PLG}$$

Aus einem Normalplasmapool (Plasma von 5 gesunden Blutspendern) wird mittels einer Verdünnungsreihe eine Bezugskurve erstellt. Die Plasminogenkonzentrationen der untersuchten Seren in Prozent der Norm werden nun aus ΔE_{PLG} über die Bezugskurve erhalten.

Mittlerweile hat der Hersteller seine Arbeitsanleitung für den Plasminogen-Farbstest abgeändert. Bei Durchführung der Plasminogenuntersuchung mit dem Farbstest ist daher die dem jeweiligen Testkit beiliegende Arbeitsanleitung zu verwenden!

3.3. Normalbereiche

Die in der Literatur und von den einzelnen Herstellern für ihre Tests angeführten Normalwerte für Plasminogen differieren selbstverständlich schon wegen der Verschiedenheit der Methoden. Wir legten unseren Untersuchungen entsprechend den Angaben der Hersteller folgende Plasminogen-Normalbereiche zugrunde:

Radiale Immundiffusionsmethode: Normalbereich = 6 - 25 mg/dl

Farbstest: Normalbereich = 80 - 120 % der Norm

4. Ergebnisse

4.1. Unterschiede in der Plasminogenkonzentration und -aktivität zwischen den verschiedenen PLG-Phänotypen

Es sollte untersucht werden, ob die den verschiedenen PLG-Phänotypen zugeordneten Seren und Plasmen signifikante Unterschiede ihres Plasminogengehalts und ihrer Plasminogenaktivität aufweisen.

Während beide verwendeten Untersuchungsmethoden Aussagen über die Plasminogenkonzentration machen lassen, so gibt die photometrische Meßmethode auch Hinweise auf Störungen der Aktivierbarkeit und Aktivität des Plasminogens, da hierbei die zur Aktivitätsentfaltung notwendige limitierte Proteolyse der Plasminogenmoleküle erfaßt wird.

Tabelle 8 gibt die Ergebnisse der Plasminogenmessung auf Partigenplatten wieder. Alle untersuchten phänotypisierten Seren - mit zwei Ausnahmen - weisen Plasminogen-Durchschnittskonzentrationen innerhalb des postulierten Normalbereichs auf. Die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten liegen angesichts des relativ kleinen Kollektivs in vertretbaren Bereichen. Der Durchschnitt aller Proben liegt bei 13.07 mg/dl.

Auffällig ist, daß die Seren der häufigen Phänotypen PLG 1, PLG 2 - 1 und PLG 2 Plasminogenkonzentrationen aufweisen, die alle nahe an diesem Durchschnittswert liegen. Die Seren der seltenen Phänotypen 1 - R und 2 - R zeigen dagegen zwar keine beträchtlichen und auf keinen Fall klinisch bedeutsame, aber doch deutliche Erniedrigungen ihres Plasminogengehalts. Die Abb. 21 gibt diesen Sachverhalt wieder.

Tab. 8 Durchschnittsgehalt an Plasminogen (radiale Immundiffusion), den PLG-Phänotypen zugeordnet

PLG	n	$\bar{x}$ (mg/dl)	s	v
1	218	12.95	2.11	16.29%
2 - 1	201	13.29	1.89	14.22%
2	45	13.70	3.18	23.21%
1 - R	14	10.77	3.23	29.99%
2 - R	6	11.07	1.79	16.17%
Total	484	13.07		

Normalbereich: 6 - 25 mg/dl

Nicht im Normbereich 2 Proben: 4.0 mg/dl --- PLG 1 - F

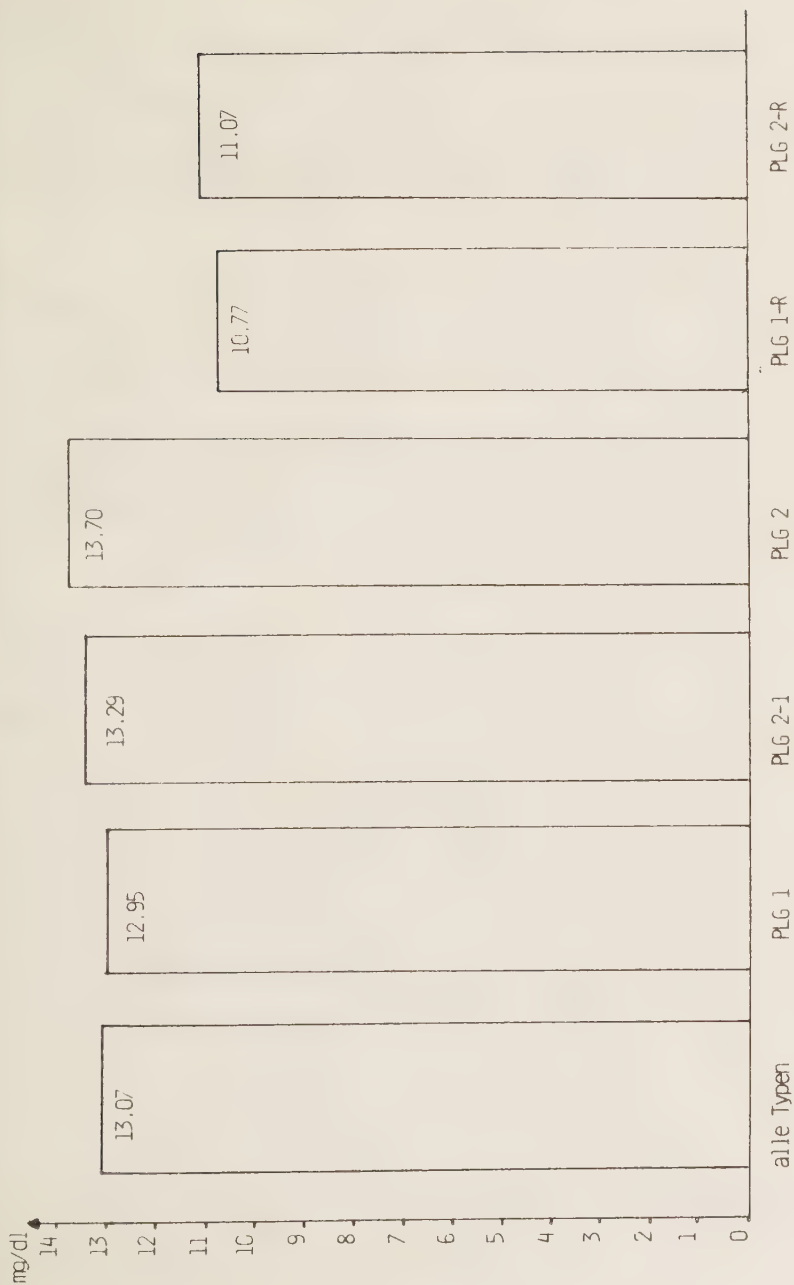
5.7 mg/dl --- PLG 1

Tab. 9 Durchschnittskonzentration und -aktivität von Plasminogen (Farb-test), den PLG-Phänotypen zugeordnet

PLG	n	$\bar{x}$ (%)	s	v
1	130	98.61	16.52	16.75%
2 - 1	98	101.66	14.88	14.64%
2	26	103.81	20.85	20.08%
1 - R	7	84.00	13.32	15.86%
2 - R	3	90.67	8.02	8.85%
Total	264	99.78		

Normalbereich: 80 - 120%

Abb. 21 Durchschnittsgehalt an Plasminogen (radiale Immun_diffusion), der PLG-Prätypen zugeordnet

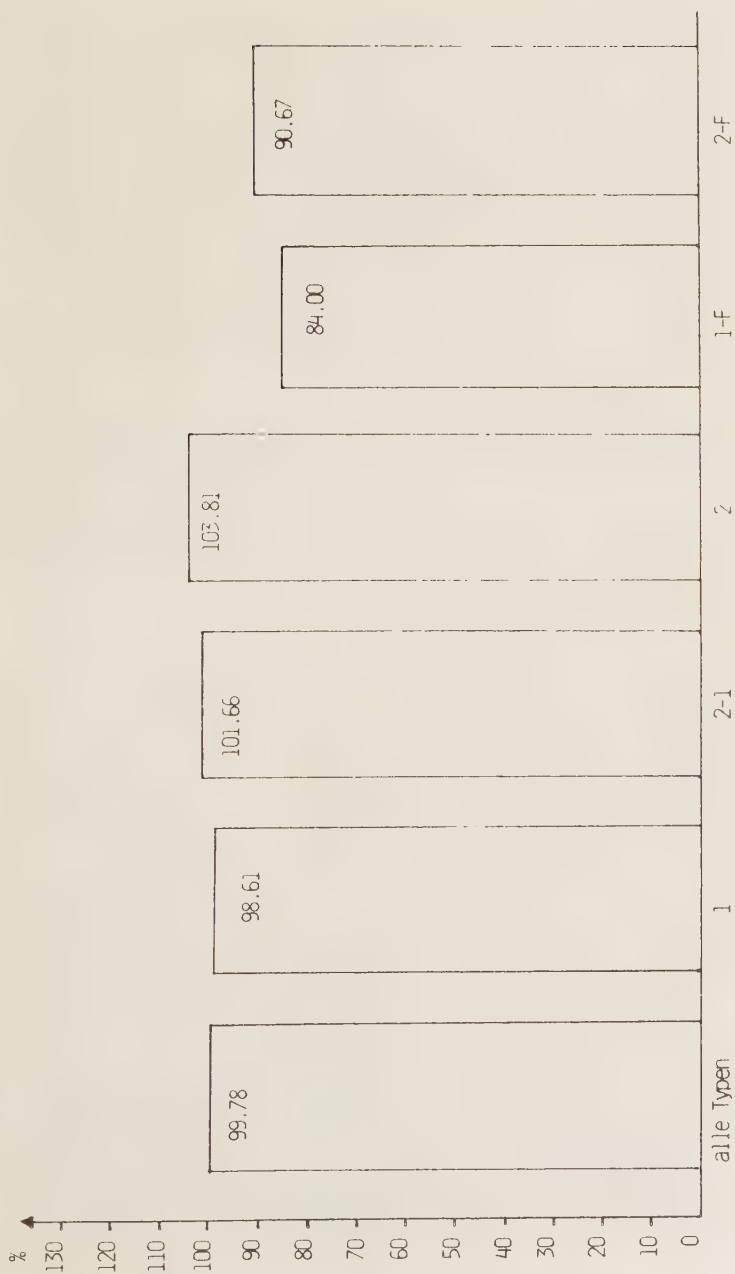


Die Messung der Plasminogenkonzentration, bzw. - Aktivität mit dem Farbttest erbrachte analoge Ergebnisse. Wie Tab. 9 zu entnehmen ist, liegen auch hier die häufigen Phänotypen in der Nähe des Durchschnittswerts von 99,78%. Die seltenen Phänotypen liegen - wiewohl immer noch eindeutig innerhalb des Normbereichs - deutlich niedriger, was in Abb. 22 grafisch veranschaulicht ist.

Die Untersuchung mit der radialen Immundiffusion erbrachte - wie auch aus Tab. 8 zu entnehmen ist - für zwei Serumproben Plasminogengehalte, die unterhalb des mit 6 - 25 mg/dl definierten Normbereichs liegen. Leider war von den entsprechenden Blutspendern kein Zitratblut für den Farbttest abgenommen worden, so daß eine Überprüfung dieses Befundes mit der photometrischen Methode nicht möglich war. Auch erneutes Blut zu einer Kontrolle war von diesen Spendern leider nicht zu erhalten.

Da die Plasminogenkonzentrationen der beiden Seren (welche als PLG I und PLG I - F phänotypisiert wurden) jedoch in einem Bereich liegen, der wohl bereits klinische Konsequenzen (wie Thromboseneigung) erwarten ließe, andererseits aber beide Blutspender bei der Routineanamnese vor der Blutspende gezielte Fragen nach einer Thrombosevorgeschichte verneinen konnten, und auch auf Grund der Anamnese und unserer Standardblutuntersuchungen im Rahmen der Blutspende eine schwerwiegende Lebererkrankung (mit konsekutiver Minderproduktion von Plasminogen) verneint werden darf, läßt sich nicht sicher ausschließen, daß diese Plasminogenerniedrigung einem Verdünnungsfehler beim Betropfen der Partigenplatten zuzuschreiben ist.

Abb. 22 Durchschnittskonzentration und -aktivität von Plasminogen (Farbtest), den PLG-Phenotypen zugeordnet.



4.2. Direkter Vergleich der Ergebnisse beider Meßmethoden

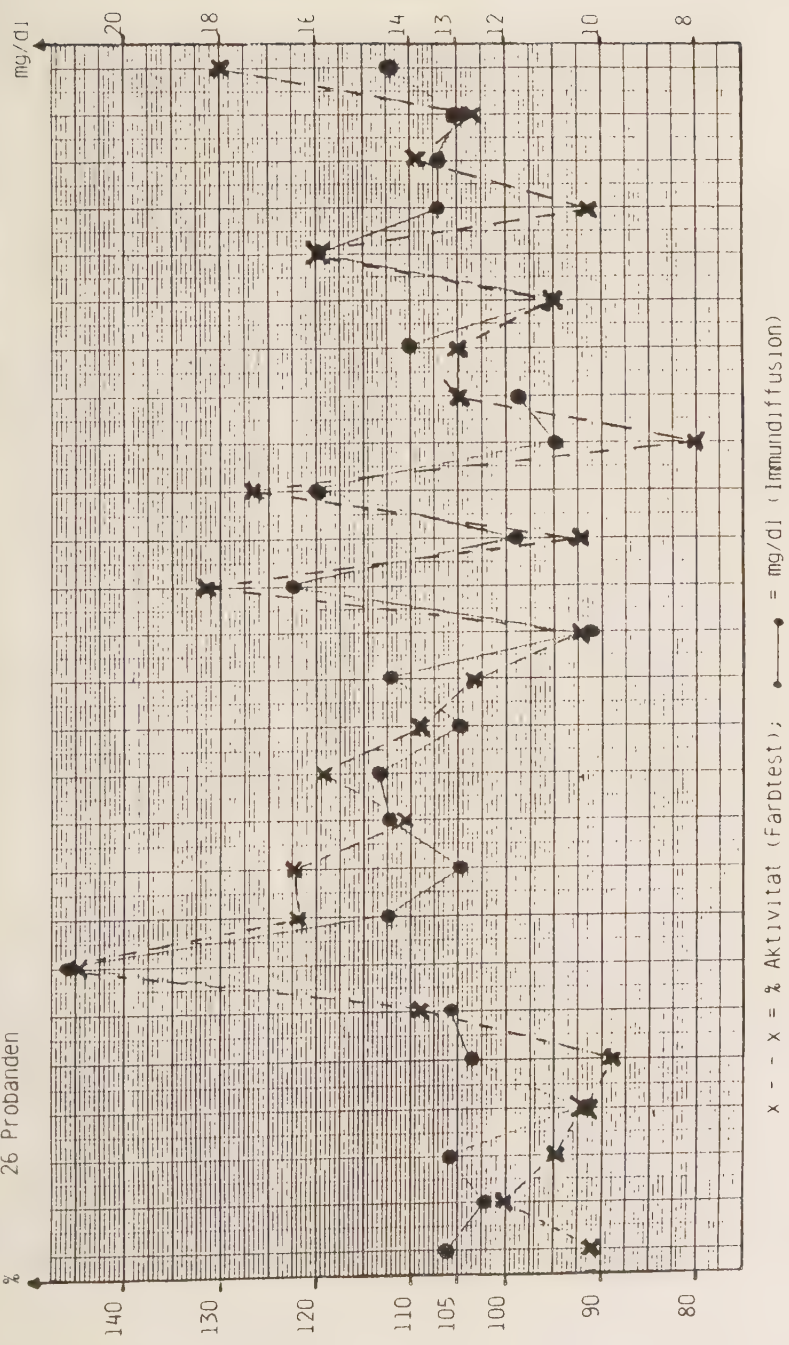
Wie bereits Abb. 21 und 22 verdeutlichen, gehen die Ergebnisse der immunologischen und der photometrischen Plasminogen-Messung in die gleiche Richtung. Die Partigenplattenmethode ergab für die untersuchten Seren einen Mittelwert von etwa 13 mg/dl mit einer Standardabweichung von 2 - 3 mg/dl. Der Farbstest erbrachte einen Mittelwert von approximativ 100% mit einer Standardabweichung von ca. 16%. Diese Ergebnisse fügen sich gut in postulierten Normalbereiche 6 - 25 mg/dl, bzw. 80 - 120% ein.

Durch die willkürliche Auswahl von mehreren einzelnen Proben und die graphische Gegenüberstellung der für sie mit beiden Methoden gemessenen Plasminogenwerte wollten wir überprüfen, inwieweit beide Methoden auch im Einzelfall übereinstimmende oder zumindest in die gleiche Richtung zielende Ergebnisse brachten.

In Abb. 23 wurde versucht, jeweils 26 Einzelergebnisse und zugleich die Gesamtrendenz beider Methoden miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden die Einzelergebnisse der jeweiligen Methode in Form einer Kurve verbunden und die beiden dadurch entstehenden Kurven übereinander projiziert. Auf Grund der von uns errechneten Mittelwerte und ihrer Einfügung in den Normalbereich ermittelten wir, daß eine mit der Partigenmethode gemessene Plasminogenkonzentration von 13 mg/dl einer im photometrischen Farbstest errechneten Konzentration, bzw. Aktivität von 105% der Norm ungefähr entspricht.

Die Abb. 23 zeigt, daß die Ergebnisse beider Untersuchungen weitgehend in die gleiche Richtung zielen und in keinem Einzelfall einander widersprechen. Gelegentlich ergibt sich sogar völlige Deckungsgleichheit des Kurvenverlaufs.

Abl. 23 Gegenüberstellung der photometrisch und immunologisch ermittelten Plasminogenwerte bei 26 Probanden



Auf Grund dieses Vergleichs ist die Feststellung gerechtfertigt, daß beide Methoden bei der Untersuchung der Plasminogenkonzentration gleichwertige Aussagekraft besitzen.

4.3. Abhängigkeit der Plasminogenkonzentration, bzw. -aktivität vom Lebensalter der untersuchten Personen

Es wurde versucht, die Ergebnisse unserer Plasminogenmessung auch dahingehend auszuwerten, ob Unterschiede bezüglich der Plasminogenkonzentration oder -aktivität durch das unterschiedliche Lebensalter der untersuchten Personen bedingt sein können, bzw. ob sich überhaupt Tendenzen zu Erhöhungen oder Erniedrigungen des Plasminogenspiegels, bzw. der -aktivität parallel zur Lebensalterstufe feststellen lassen.

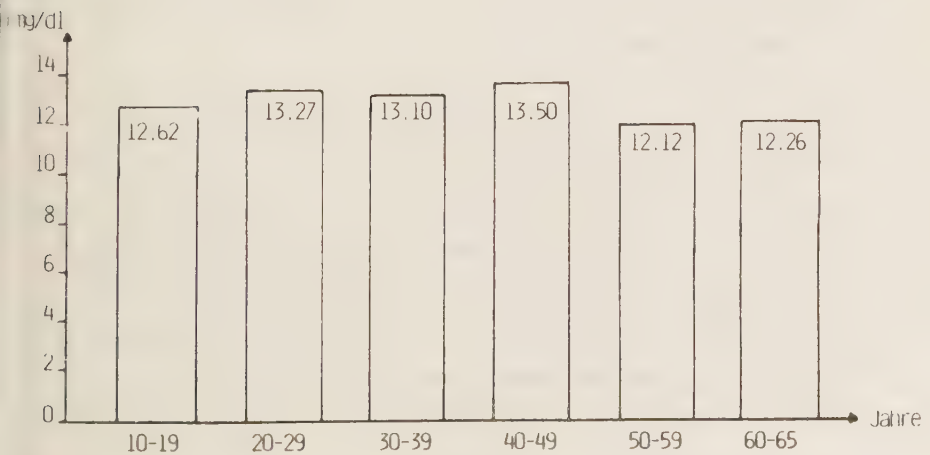
Zu diesem Zweck schlusstellten wir das untersuchte Kollektiv in 6 Lebensabschnitte "unter 20 Jahre", "20 - 29 Jahre", "30 - 39 Jahre", "40 - 49 Jahre", "50 - 59 Jahre", "60 Jahre und älter" auf. Die Ergebnisse dieser Aufschlüsselung sind den Tab. 10 und 11 zu entnehmen und in den Abb. 24 und 25 verdeutlicht.

Die Untersuchung der Altersabhängigkeit bei den mittels der Immundiffusion untersuchten 484 Seren ergab folgende Tendenz: Nach einem etwas niedrigeren Plasminogenspiegel in den ganz jungen Lebensjahren (wobei zu berücksichtigen ist, daß unter den untersuchten Probanden sich auch einige Kinder von Blutspendern befanden, denen Blut zur Blutgruppenbestimmung abgenommen wurde und die damit neben den 18 - 19jährigen Blutspendern (Mindestalter 18 Jahre!) in dieser Altersgruppe subsummiert wurden) scheint sich der Durchschnitts-Plasminogengehalt auf einem höheren Plateau zwischen 13 und 14 mg/dl zu bewegen. Mit zunehmendem Alter scheint der Plasminogenspiegel wieder zu sinken, wobei vor allem das überschrei-

Tab. 10 Altersverteilung der Plasminogenkonzentration (radiale Immundiffusion)

Alter	n	$\bar{x}$ (mg/dl)	s	v
20	31	12.62	1.71	13.54%
20 - 29	163	13.27	2.45	18.46%
30 - 39	119	13.10	1.93	14.73%
40 - 49	105	13.50	2.45	18.14%
50 - 59	49	12.12	1.74	14.35%
60 - 65	17	12.26	1.60	13.05%
Total	484			

Abb. 24 Altersverteilung der Plasminogenkonzentration (radiale Immundiffusion)



ten des 5. Lebensjahrzehnts in unserer Untersuchung einen gewissen Abfall des Plasminogenspiegels zu markieren scheint.

Selbstverständlich sind diese Tendenzen nur unter gewissen Vorbehalten zu werten, da durch die Einteilung in Altersgruppen zum Teil sehr kleine Kollektive (Altersgruppe 50 - 59 Jahre: 49 Personen; über 60 Jahre: 17 Personen) entstanden, was natürlich die Ableitung einer Gesamttendenz erschwert. Allerdings scheint gerade bei den beiden erwähnten Altersgruppen mit einer Standardabweichung von 1.74 und 1.6 und Variationskoeffizienten von 14.35% bzw. 13.05% ein gewisser Gleichklang und damit eine Verlässlichkeit der Werte zu bestehen.

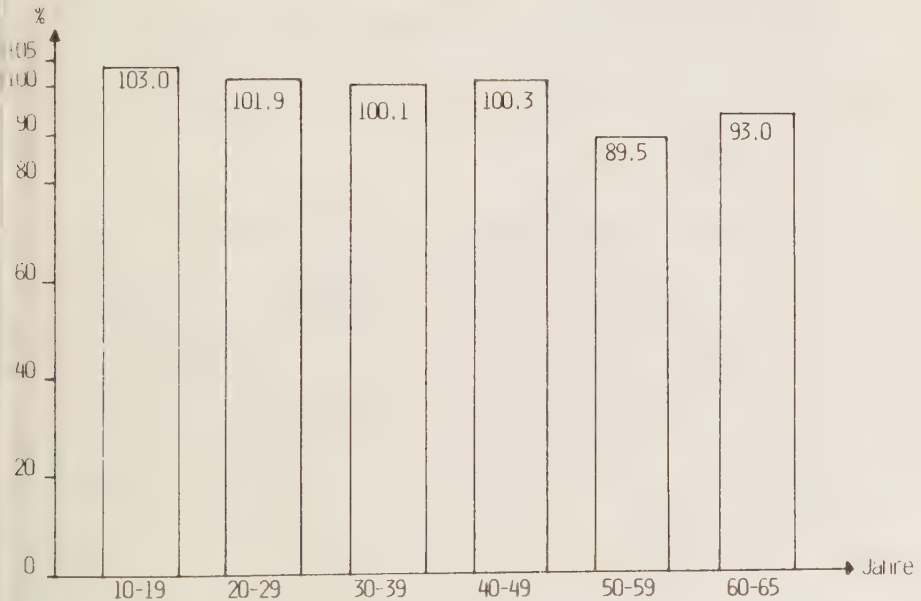
Die Altersgruppenuntersuchung der 264 photometrisch ermittelten Plasminogen-Werte erbrachte wie der Tab. 11 und der Abb. 25 entnommen werden kann, ein ähnliches Profil. Hier fiel lediglich ein relativ hoher Wert für die niedrigste Lebensaltersstufe aus dem Rahmen, der vielleicht dahingehend gedeutet werden konnte, daß ein etwas niedrigerer Plasminogengehalt in jungen Jahren durch eine dafür unbeeinträchtigte Plasminogenaktivität kompensiert wird. Diese Aktivitätserhöhung wurde sich nur bei der auch die Plasminogen-Aktivität erfassenden Farbmethode, nicht aber bei der Partigen-plattenmethode niederschlagen.

Es ist allerdings anzumerken, daß das Kollektiv der unter 20jährigen bei der Farbtestuntersuchung mit 13 Personen sehr klein war und sich bei einer größeren Anzahl vielleicht doch andere Tendenzen - eher analog zum "Partigen-Kollektiv" - ergeben hätten. Andererseits konnte sich diese Tendenz einer hohen Plasminogenkonzentration in der Jugend natürlich auch durch die Untersuchung einer größeren Anzahl von Personen mit der Partigen-Plattenmethode bestätigen. Resumierend bliebe zu sagen, daß die sich heraus-

Tab. 11 Altersverteilung der Plasminogenkonzentration, bzw. -aktivität (Farbtest)

Alter	n	$\bar{x}(\%)$	s	v
20	13	103	13.2	12.81%
20 - 29	80	101.90	17.0	16.68%
30 - 39	63	100.15	16.7	16.67%
40 - 49	68	101.30	17.4	17.17%
50 - 59	26	89.50	12.6	14.00%
60 - 65	14	93	10.0	10.75%
Total	264			

Abb. 25 Altersverteilung der Plasminogenkonzentration, bzw. -aktivität (Farbtest)



kristallisierenden Tendenzen einer Altersabhängigkeit der Plasminogenkonzentration und -aktivität nur durch weitere, mehr Probanden umfassende Untersuchungen bestätigt werden können.

4.4. Geschlechtsabhängige Unterschiede der Plasminogenkonzentration und -aktivität

Eine zusätzliche Auswertung unserer Untersuchungsergebnisse sollte die Frage überprüfen, ob zwischen den männlichen und weiblichen Probanden signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Plasminogenkonzentration und -aktivität bestanden.

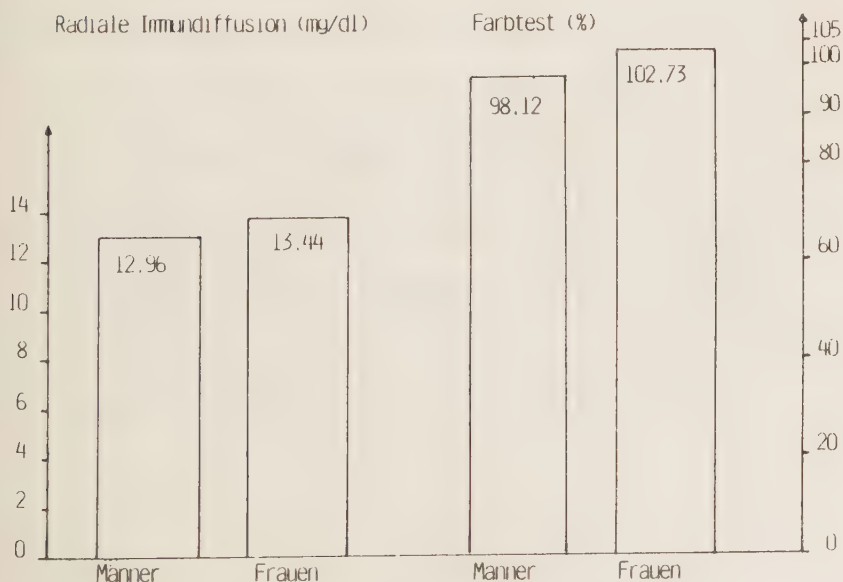
Diese Frage war nur zum Teil spekulativer Natur, sind doch bei den meisten Labortechnisch meßbaren biologischen oder medizinisch-chemischen Substraten geschlechtsspezifische Unterschiede im Normalbereich und in den Durchschnittswerten festzustellen. Klinische Relevanz könnte zudem die Beobachtung einer Konzentrations- oder Aktivitätsdifferenz des Plasminogens zwischen Männern und Frauen bekommen, wenn sich daraus etwa geschlechtsspezifisch verstärkte Thromboseneigungen durch Plasminogenerniedrigung ableiten ließen.

Tab. 12 gibt die Ergebnisse dieser Auswertung wieder. Das überraschende an dieser Untersuchung ist, daß die Gruppe der Frauen in unserem Probandenkollektiv sowohl höhere Plasminogen-Durchschnittskonzentrationen als auch -aktivitäten zeigte (Abb. 26). Es ist allerdings zu bemerken, daß die Werte der Männer und der Frauen beide sehr nahe bei den für das gesamte Kollektiv errechneten Durchschnittswerten liegen, so daß die Frage einer signifikanten Differenz und erst recht die einer klinischen Relevanz von der vorliegenden Untersuchung verneint werden muß. Auch waren die

Tab. 12 Geschlechtsabhängige Unterschiede der Plasminogenkonzentration und -aktivität

Geschlecht	n	$\bar{x}$	s	v
Radiale Immundiffusion ($\bar{x}$ = mg/dl):				
männlich	353	12,96	1,48	11,41%
weiblich	131	13,44	2,96	22,02%
Total	264	13,07		
Farbtest ($\bar{x}$ = %)				
männlich	177	98,12	15,04	15,32%
weiblich	87	102,73	20,27	19,73%
Total	264	99,78		

Abb. 26 Geschlechtsabhängige Unterschiede der Plasminogenkonzentration und -aktivität



Standardabweichungen und Variationskoeffizienten in beiden Geschlechtsgruppen etwa gleich groß, so daß man von etwa gleich großen Quoten an "Ausreißern nach unten und oben" ausgehen kann.

4.5. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Da sich Blutspendetermine an denselben Orten in der Regel viertel- bis halbjährlich wiederholen (die Blutspenderichtlinien erlauben die 4malige Blutspende in 1 Jahr), war es möglich, eine gewisse Anzahl (18) der gleichen Blutspender ein halbes Jahr später noch einmal zu untersuchen.

Nach Feststellung der Identität und Vergleich mit den Unterlagen der vorhergehenden Untersuchung konnten wir bei 18 Seren noch einmal eine Phantotypisierung auf Cellogelfolien und eine Messung des Plasminogengehalts mittels Immundiffusion vornehmen. Tab. 13 zeigt eine Gegenüberstellung der Einzelergebnisse vom März und vom Oktober 1984:

Die PLG-Phantotypen bestätigten sich wie erwartet, was ein zusätzlicher Hinweis auf die gute Ablesbarkeit der Cellogelfolien-Methode ist. Bei den gemessenen Plasminogenkonzentrationen ergaben sich nur geringfügige Unterschiede, zum Teil kam es zu fast deckungsgleichen Ergebnissen, insgesamt betrachtet liefen die Werte tendenziell in die gleiche Richtung. Dies deutet doch auf eine gewisse Konstanz der Plasminogenspiegel mit nur geringen Schwankungen nach oben oder unten bei klinisch gesunden Personen hin.

Tab. 13 Individuelle Reproduzierbarkeit: Vergleich des PLG-Phänotyps und der Plasminogenkonzentration nach neuerlicher Blutentnahme und -untersuchung (1/2 Jahr später) mit dem Ergebnis der ersten Bestimmung bei denselben Probanden

Marz 1984		Oktober 1984	
PLG-Phänotyp	Konzentration (mg/dl)	PLG-Phänotyp	Konzentration (mg/dl)
2	10.0	2	11.0
1	12.2	1	11.8
2-1	10.4	2-1	11.2
1	12.2	1	12.8
2-1	13.0	2-1	14.2
2-1	11.0	2-1	11.0
2-1	14.5	1	13.0
1	11.3	1	11.1
1	9.5	1	10.2
2-1	12.8	2-1	12.3
2-1	12.3	2-1	12.2
2	12.8	2	13.1
1	13.2	1	13.1
1	12.8	1	14.0
1	13.2	1	14.2
1	11.5	1	12.1
2-1	11.5	2-1	12.2
1	13.2	1	12.5

4.6. Alterungsversuch: Plasminogenkonzentration und -aktivität nach einjähriger Lagerung der Seren bei -37° C

Auf die Ergebnisse dieser Untersuchung wurde bereits an früherer Stelle der vorliegenden Arbeit vorgegriffen. Es sollte überprüft werden, welche Konzentrations- und Aktivitätsänderungen des Plasminogens im Laufe einer längeren Lagerung im Gefrierschrank eintreten und ob diese Veränderungen Konsequenzen für die Darstellbarkeit der Proben bei der Phänotypisierung haben könnten. Außerdem sollte untersucht werden, ob mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren ebenfalls Auswirkungen auf Gehalt, Konzentration oder Typisierbarkeit des Plasminogens haben.

Zu diesem Zwecke wurden nach Ablauf eines Jahres 20 Seren photometrisch und immunologisch auf ihre Plasminogenkonzentration und -aktivität untersucht, von denen im Laufe des Jahres die Hälfte 7mal, die anderen 10 nur 2mal aufgetaut worden waren. Außerdem wurden diese 20 Seren noch einmal einer PLG-Typisierung unterzogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tab. 14 zusammengefaßt.

Die Phanotypisierung der 20 Seren ergab dieselben, wie im Vorjahr abgelesenen PLG-Phanotypen, die durchwegs klar und deutlich ablesbar waren; lediglich 2 Seren mußten, da sie auf der Folie nur verwischt dargestellt waren, ein 2. Mal untersucht werden, wobei der Phanotyp schließlich ebenfalls eindeutig ablesbar war.

Die immunologische Bestimmung des Plasminogengehalts mittels der Immundiffusion auf Partigenplatten brachte für die 10 Seren, die nur einmal im Vorjahr und jetzt ein 2. Mal aufgetaut worden waren, einen Durchschnittsplasminogengehalt von 10.4 mg/dl. Dies kommt gegenüber dem Durchschnittsgehalt von 13.2 mg/dl bei der Messung im Vorjahr einer Erniedrigung des immunologisch bestimmbaren Plasminogens in den ein ganzes Jahr im Gefrierschrank gelagerten Seren auf 78.7% des Ausgangswertes gleich.

Die anderen 10 Seren, die zwischen der ersten und der neuerlichen Untersuchung in Abständen von ca. 2 Monaten 5 mal aufgetaut (wobei jeweils zur Simulierung einer Probenentnahme eine Pipettenspitze in das Serum enthaltende Hutchen getaucht wurde) und wieder eingefroren worden waren, wiesen einen Plasminogendurchschnittsgehalt von 11.7 mg/dl auf. Dies bedeutet eine Minderung des immunologisch erfaßbaren Plasminogens gegenüber dem Vorjahreswert von 14.1 mg/dl auf 82.9% des Ausgangswertes.

Tab. 14 PLG-Typisierung und Bestimmung von Plasminogenkonzentration und -aktivität nach einjähriger Lagerung der Serien im Gefrierschrank. Vergleich mit den Ergebnissen des Vorjahres

Marz 1984		Marz 1985			
PLG-Phänotyp	Konzentration(mg/dl)	Aktivität(%)	PLG-Phänotyp	Konzentration(mg/dl)	Aktivität(%)
Proben 2x aufgetaut:					
2-1	14.5	80	2-1	9.6	49
2-1	12.8	83	2-1	9.6	47
1	12.8	75	1	12.0	47
2-1	10.4	75	2-1	11.0	41
2-1	14.5	84	2-1	11.0	47
1	16.0	101	1	11.0	48
1	16.0	103	1	10.6	57
1	12.3	99	1	9.6	46
1	10.4	87	1	8.8	42
2-1	12.8	90	2-1	11.0	51
Durchschnitt:	13.2	87.7		10.4	47.5
Proben 7x aufgetaut:					
2-1	12.3	72	2-1	10.6	57
2	16.9	95	2	10.6	56
1	18.2	113	1	13.2	65
1	14.7	90	1	13.0	61
1	12.8	99	1	12.6	46
1	16.0	86	1	12.0	57
2-1	12.3	95	2-1	11.0	42
2-1	12.8	95	2-1	11.0	58
1	12.8	83	1	12.0	57
2-1	12.8	90	2-1	11.0	55
Durchschnitt:	14.1	91.8		11.7	55.4

Zwischen den Plasminogenkonzentrationen der 2mal und der 7mal aufgetauten Seren zeigte sich also kein statistisch relevanter Unterschied. Die relativ kleine Erniedrigung des immunologisch bestimmbaren Plasminogengehalts um ca. 20% erklärt den Umstand, daß sich die PLG-Typen auch nach einjähriger Lagerung im Gefrierschrank eindeutig bei der Immunfixations-elektrophorese darstellen lassen.

Die nochmalige Untersuchung der Seren mittels des photometrischen Farbttests erbrachte etwas andere Ergebnisse. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, daß es sich bei den im Vorjahr untersuchten Proben um frische Zitratplasmen handelte, während für die 2. Untersuchung nur noch die für die Phänotypisierung eingefrorenen Seren derselben Blutspender zur Verfügung standen. Freilich sind die Plasminogenkonzentrationen im Plasma und Serum als etwa gleich hoch beschrieben, so daß man davon ausgehen kann, daß bei der ersten Untersuchung in den frischen Seren ungefähr die selben Plasminogenkonzentrationen vorzufinden waren wie in den frischen Plasmen.

Ein Vergleich der Plasminogenwerte der 1 Jahr gelagerten Seren mit den Ausgangswerten der frischen Plasmen hat daher durchaus seine Berechtigung. Verdünnungsfehler wurden bei der Folgeuntersuchung dadurch ausgeschaltet, daß den Serumproben vor der Untersuchung mit dem Farbttest Zitrat im selben Verhältnis zugegeben wurde, wie es bei den Zitratplasmen der Fall war (1 : 10).

Der Tab. 14 ist zu entnehmen, daß die ein Jahr im Gefrierschrank gelagerten, 2mal aufgetauten Seren eine durchschnittliche Plasminogenaktivität von 47,5% aufwiesen. Gegenüber den Ausgangswerten der Frischplasmen (Mittelwert 87,7%) bedeutet dies einen Abfall der Plasminogenaktivität, und damit des mittels eines funktionellen Tests erfassbaren Plasminogens, auf 54% der Anfangsaktivität.

Für die mehrmals aufgetauten Proben (Durchschnittswert 55.4%) war gegenüber den Ausgangswerten (91.8%) ein Abfall auf 60% festzustellen.

Während sich also auch bei dieser Untersuchung keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den selten und den öfters aufgetauten Seren zeigten, war hier doch bei allen Seren ein stärkerer Abfall des funktionell bestimmbaren Plasminogens im Vergleich zur immunologischen Bestimmungsmethode zu verzeichnen.

Während man als Konsequenz dieser Ergebnisse also davon ausgehen kann, daß sich PLG-Phänotypisierungen auf immunologischer Basis (wie die Immunfixations-elektrophorese) auch bei länger eingefrorenen Seren ohne größere Darstellungsprobleme durchführen lassen, dürfte man für die Darstellung der PLG-Phänotypen mit funktionellen Methoden (etwa fibrinolytischer Overlay) durch das Abnehmen der Plasminogenaktivität mit zunehmender Lagerungsdauer der Seren größere Schwierigkeiten und schlechtere Ergebnisse erwarten.

E DISKUSSION

1. Kritik der Methoden

1.1. Immunfixationselektrophorese auf Cellogelefolien

Bei der Darstellung von genetisch polymorphen Proteinsystemen ist die Elektrophorese inzwischen weitgehend von der Isoelektrofokussierung (IEF) abgelöst worden. Letztere bietet durch ihr besseres Auflösungs- und Auftrennungsvermögen unbestreitbare Vorteile für die Differenzierung von Subtypen bzw. weiteren Varianten. Die Einführung der IEF hat bereits in einigen Systemen zu einer Erweiterung der Phäno- und Genotypen-Anzahl geführt.

Insofern muß die Verwendung der historisch älteren Methode der Elektrophorese für die Darstellung des Plasminogen-Systems, das immerhin auch auf Grund von IEF-Untersuchungen (7, 27) in die Humangenetik eingeführt wurde, schon fast als Anachronismus erscheinen.

Nichtsdestoweniger waren es die positiven Äußerungen verschiedener Anwender der Immunfixationselektrophorese auf Cellogelefolien zur Plasminogen-Typisierung (11, 15), die den Anstoß zur Verwendung dieser Methode für die vorliegende Arbeit gaben.

Auch diese Untersuchung kann die positiven Beurteilungen der Cellogelelektrophorese im Hinblick auf die Darstellung des Plasminogen Polymorphismus nur unterstützen.

Wenn man die vorliegende Literatur über das PLG-System sichtet, so lassen sich bei einem Vergleich der mittels IEF und der mittels Cellogelelektro-

phorese dargestellten PLG-Phänotypen keine gravierenden Unterschiede bezüglich Variantenreichtum oder eventueller Subspezifitäten feststellen. Die in Abb. 6 vorgeführte Synopsis der von verschiedenen Autoren dargestellten PLG-Allele zeigt, daß die Anzahl der von HUMMEL mit der Immunfixationselektrophorese auf Cellogelelfolien gefundenen seltenen PLG-Allele der von anderen Untersuchern mittels IEF dargestellten Menge nicht oder nur geringfügig nachsteht. Lediglich EIBERG (5), der im F-Bereich, also im anodalen Teil, eine zusätzliche Variante 9, und im M-Bereich eine zusätzliche Variante 7 finden konnte, sowie MAUFF, KUHNLE und DYKES, die im M-Bereich die zusätzliche Variante M, bzw. 8 bzw. W darstellen konnten, haben bisher 1, bzw. 2 Variante(n) mehr beschrieben (16, 13).

Die vorliegende Arbeit konnte zwar nicht alle bisher mit der Cellogel-Elektrophorese gefundenen seltenen Phänotypen aufzeigen, aber es gelang immerhin die Darstellung der Varianten PLG 1-F, 2-F und 2-M.

Während die PLG-Typisierung durch Immunfixationselektrophorese auf Cellogelelfolien also einerseits - was die Darstellbarkeit der Phänotypen betrifft - kaum Nachteile gegenüber der IEF hat, so bietet sie andererseits sogar einige nicht unwichtige Vorteile:

Der wohl wichtigste liegt darin, daß die Handhabung dieser Methode denkbar einfach ist. Dadurch ist es möglich, die Technik leicht und schnell zu erlernen und sie auch bald in die Routineanwendung zu übernehmen. Außerdem lehrt die Erfahrung, daß weniger komplexe Untersuchungsmethoden in der Regel weniger Fehlerquellen bieten bzw. im Falle eines Fehlers diesen leichter analysieren lassen.

Ein weiterer großer Vorteil der Methode liegt in dem relativ kleinen Aufwand an Geräten, Reagenzien und sonstigen Materialien, der die Methode als einigermaßen kostengünstig erscheinen läßt. Insgesamt gesehen ist also der Meinung von LATTKE und KRONE (15), die die Darstellung des PLG-Systems mit der Immunfixationselektrophorese als "zuverlässig, gut reproduzierbar und schneller und ökonomischer durchführbar als die bisher verwendeten Darstellungstechniken" bezeichneten, genauso beizupflichten wie der Feststellung HUMMELS: "Die elektrophoretische Auftrennung von PLG auf Cellogele-Folien erscheint uns gegenüber den bisher benutzten Methoden (Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid-Gel; Elektrophorese im Agarose-Gel) hinsichtlich Einfachheit und Ökonomie vorteilhaft" (11).

1.2. Konzentrations- und Aktivitätsmessung von Plasminogen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels der Immundiffusion auf Partigenplatten ist eine seit langem eingeführte, immer noch häufig angewendete Labormethode. Sie besticht durch die einfache Handhabung und den geringen Aufwand.

Bei der Einführung neuer Methoden zur direkten oder indirekten Messung der Plasminogen-Konzentration wird diese Methode nach wie vor als Referenzmethode der Wahl verwendet (12), da sie Aussagen über den objektiv erfaßbaren Gehalt an Plasminogen ohne Beeinflussung durch Aktivitätsschwankungen ermöglicht.

Ein weiterer Vorteil der Partigenplattenmethode liegt in der Möglichkeit, die Platten nach Ablauf der Immundiffusion zeitlich fast unbegrenzt aufzubewahren und damit die Ergebnisse jederzeit direkt zu dokumentieren. Ein

Nachteil liegt sicher in den relativ großen Kosten der Partigenplatten.

In dieser Hinsicht ist der photometrische Farbttest zur Messung der Plasminogenaktivität bzw. -Konzentration bestimmt günstiger. Ein weiterer Vorteil dieses Farbttests ist, daß die Ergebnisse bereits nach etwa einer Stunde ermittelt werden können, während die Immundiffusionsmethode eine Inkubationszeit von etwa 2 Tagen erfordert. Dieser Zeitvorteil spielt zwar bei einer experimentellen Untersuchung wie der vorliegenden keine große Rolle, hat jedoch für ein unter klinischen Anforderungen arbeitendes Labor entscheidende Vorteile.

Die Handhabung des Farbttests erfordert zwar durch die mehrfache Zugabe von Lösung und durch das einen Zeittakt folgende Pipettieren etwas mehr handwerkliche Geschicklichkeit bzw. Übung, läßt sich aber trotzdem - auch nach nur kurzer Einarbungszeit - mit einer größeren Menge an Proben reibungslos durchführen.

Was die Aussagekraft beider Methoden betrifft, so ist ein Vergleich natürlich nur unter dem Vorbehalt möglich, daß beide Methoden nicht das Gleiche messen. Mit der Partigenplatten-Methode läßt sich der Gehalt an immunologisch erfassbaren Plasminogen ermitteln, während der Farbttest primär die Aktivität des in der Probe enthaltenen Plasminogens erfaßt und damit erst sekundär Rückschlüsse auf die Plasminogenkonzentration erlaubt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen aber - wie bereits an anderer Stelle erwähnt - den Schluß zu, daß beide Methoden in etwa gleich zuverlässiger Weise die Plasminogenkonzentration - intakte Aktivität vorausgesetzt - erfassen können.

2. Kritik der Ergebnisse

Die im Rahmen der populationsgenetischen Untersuchung ermittelten Phänotypenverteilungen und Genfrequenzen des Plasminogens im ostbayerischen Raum sind - wie die Überprüfung mittels des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts zeigt - in guter Übereinstimmung und liefern damit einen weiteren Beitrag zur Vervollständigung der Daten über den Plasminogen-Polymorphismus in Deutschland. Sie fügen sich gut in die bereits veröffentlichten Verteilungen der Plasminogentypen im deutschen Raum ein und entsprechen auch den Ergebnissen ausländischer Untersuchungen.

Der Nachweis der Vererbung des seltenen Allels PLG*F über drei Generationen erscheint insofern von Bedeutung, als bei der Darstellung eines relativ neuen Polymorphismus nicht zuletzt wegen der zumeist nicht standardisierten Darstellungsmethode anfangs gewisse Unsicherheiten beim Untersucher bestehen, ob Bandenmuster, die *prima vista* als seltene Phänotypen oder Varianten imponieren, nicht durch methodische Fehler (Neuraminidase-Behandlung!) entstanden sind und das Auftreten eines seltenen Allels nur vortauschen.

Daß sich bei den durchgeführten Eltern-Kind-Untersuchungen keine einzige Abweichung vom autosomal-kodominanten Erbgang des Plasminogens ergab, dürfte auf Grund der bisher veröffentlichten Ergebnisse über den Plasminogen-Polymorphismus erwartet werden (7, 11, 17, 27). Hier wurde dem genetischen Mosaik ein weiteres Steinchen hinzugefügt.

Auch der Wert des Plasminogen-Systems für die Vaterschaftsbegutachtung wurde bereits von mehreren Autoren (19, 32, 35) hervorgehoben und konnte durch unsere retrospektive Untersuchung von Vaterschaftsausschlußfällen,

von denen 18% auch einen Ausschluß im PLG-System ergeben hatten, bekräftigt werden.

Mit der Messung von Plasminogen-Durchschnittsaktivität und -konzentration der einzelnen Plasminogenphanotypen sollte die Frage überprüft werden, ob bestimmte PLG-Phanotypen bzw. -Allele (evtl. vor allem die seltenen!) einen Mindergehalt oder eine Minderaktivität des Plasminogens aufweisen. Hinweise auf einen solchen Zusammenhang einer quantitativen oder funktionellen Defizienz mit der Zugehörigkeit zu einem bestimmten PLG-Phanotyp waren der Untersuchung von SACHS entnommen (28), der bei seinen mit monospezifischen Antiplasminogenseren im Agargeldiffusionstest untersuchten Plasmen feststellte, daß die "Plasmen des Typs III stets eine geringere fibrinolytische Aktivität aufwiesen als die Typen I und II", und der deswegen vermutete, daß diesen Gruppen "neben dem genetischen Interesse auch klinische Bedeutung zukommen" könne.

NAKAMURA berichtete über eine von ihm gefundene, seltene PLG-Allel-Variante PLGN * MJ, die nur mit einer geringen oder fast fehlenden Plasminogen-Aktivität assoziiert war (21).

Bei einer Plasminogen-Minderfunktion solchen Ausmaßes kam der Aufdeckung einer Phanotypen-abhängigen Plasminogendefizienz natürlich auch klinische Bedeutung zu .

Bei unseren Untersuchungen stellten wir zwar eine Minderung sowohl der Plasminogenkonzentration als auch der Plasminogenaktivität bei den seltenen PLG-Phanotypen (PLG 1-R, 2-R) im Vergleich zu den häufigen Phanotypen (PLG 1, 2-1 und 2) fest. Eine klinische Relevanz muß diesem Tatbestand jedoch abgesprochen werden, da - mit Ausnahme zweier Seren (siehe Absatz 4.1.) - alle Proben und damit auch alle PLG-Phanotypengruppen Plasminogenkonzen-

trationen und -aktivitäten aufweisen, die im Normbereich liegen.

Die auf Grund unserer Untersuchungen mögliche Feststellung, daß Plasminogen Spiegel und Plasminogenaktivität ab einem Lebensalter von etwa 50 Jahren absinken, könnte zumindest tendenziell ein klinisch interessanter Hinweis sein. Wenn man nämlich die Entstehung von Thrombosen als multifaktorielles Geschehen betrachtet, an dem eine Störung der Fibrinolyse beteiligt ist, kann eine altersbedingte Abnahme des fibrinolytisch wirkenden Plasminogens als ein mitverantwortlicher Faktor für eine erhöhte Thromboseneigung im fortgeschrittenen Lebensalter angesehen werden.

Daß bei unseren Untersuchungen für die Gruppe der weiblichen Probanden höhere Plasminogenkonzentrationen und -aktivitäten festgestellt wurden als für den männlichen Teil der untersuchten Personen, darf als etwas überraschendes Ergebnis gewertet werden, das konträr zu den meisten anderen meßbaren biologischen oder medizinisch-chemischen Stoffen verläuft, bei denen in aller Regel die Männer höhere Durchschnittswerte aufweisen.

Der Einsatz der Plasminogenmessung beim screening eines größeren Kollektivs mit dem Ziel, durch pathologische Plasminogenwerte Hinweise auf das Vorliegen von Erkrankungen zu erhalten, scheint von recht begrenztem Nutzen zu sein. Tatsächlich außerhalb des Normalbereichs liegende Plasminogenkonzentrationen oder -aktivitäten sind wohl zu selten und Schwankungen der Plasminogenwerte zu unspezifisch, als daß man die Plasminogenmessung ungezielt anwenden könnte.

Von den 484 von uns untersuchten Blutspendern lagen bis auf 2 (0.4%) alle innerhalb der postulierten Normalbereiche. Und selbst bei diesen 2 Personen, bei denen scheinbar pathologisch erniedrigte Plasminogenwerte gefunden wurden,

ergaben sich keine anamnestischen oder labordiagnostischen Hinweise auf eine massive Störung der Fibrinolyse oder eine anderweitige, eine Plasminogenminderproduktion bedingende Erkrankung.

Sowohl unsere Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (1/2 Jahr nach der Erstuntersuchung) als auch der Alterungsversuch (1 Jahr nach der Anfangsuntersuchung) zeigen das Plasminogen sowohl für die quantitativ-funktionellen wie für die phänotypisierenden Bestimmungsmethoden als vergleichsweise stabiles System.

Nach einjähriger Lagerung im Kuhlshrank war lediglich ein etwas stärkerer Abfall der mit dem photometrischen Farbttest bestimmbaren Plasminogen-Aktivität zu verzeichnen. Probleme bei der Darstellung der Plasminogen-Phänotypen mit funktionellen Methoden (etwa mit dem fibrinolytischen Overlay) durften aber trotzdem erst nach längerer (oder unsachgemäßer) Lagerung der Proben auftauchen.

Der immunologisch bestimmte Plasminogengehalt zeigte sich freilich noch stabiler, so daß die PLG-Phänotypisierung mit der Immunfixations-Elektrophorese auch bei länger als 1 Jahr eingefrorenen Seren ohne Schwierigkeiten durchzuführen sein dürfte.

F ZUSAMMENFASSUNG

Das Plasminogen stellt die Vorstufe des fibrinolytisch wirksamen Plasmins dar und spielt somit eine wichtige Rolle im Gesamtkomplex der Hämostase.

Seit 1979/80 ist mit den Arbeiten von RAUM und HOBART der genetische Polymorphismus des Plasminogens in das Gebiet der Humangenetik und Paternitätsbegutachtung eingeführt.

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse von Untersuchungen über das Plasminogen vorgestellt, die mit 3 verschiedenen Methoden durchgeführt wurden:

Zum einen die Typisierung der Plasminogen-Phänotypen mittels der Immunfixations-Elektrophorese und zum andern die quantitativ-funktionelle Bestimmung der Plasminogenkonzentration, bzw. -aktivität mittels der radiellen Immundiffusion, bzw. eines photometrischen Farbtests.

1. Bestimmung von PLG-Phänotypen durch Elektrophorese auf Cellogel-Folien und anschließende Immunfixation

484 Seren von freiwilligen Blutspendern aus dem ostbayerischen Raum wurden PLG-typisiert. In diesem Kollektiv ergaben sich folgende prozentuale Häufigkeiten für die PLG-Phänotypen:

PLG 1 = 45.04%; PLG 2-1 = 41.53%; PLG 2 = 9.3%; PLG 1-R = 2.89%;
PLG 2-R = 1.24%.

Die entsprechenden Allelfrequenzen lauten:

$$PLG*1 = 0.6725; PLG*2 = 0.3068; PLG*R = 0.0207.$$

Im Rahmen einer Familienuntersuchung konnte die Vererbung einer seltenen Variante PLG*F über 3 Generationen nachgewiesen werden. In 51 Eltern-Kind-Untersuchungen wurde kein Abweichen vom autosomal-kodominanten Erbgang des Plasminogens festgestellt.

Die Seren von 137 Personen, die an 41 Fällen der Vaterschaftsbegutachtung beteiligt waren, welche mit einem Ausschluß der potentiellen Vater (Kläger, Beklagte, Zeugen) geendet hatten, wurden ebenfalls PLG-typisiert. In 18% der Fälle konnte auch ein Vaterschaftsausschluß im PLG-System bestätigt werden.

2. Quantitativ-funktionelle Bestimmung des Plasminogens mit der radialen Immundiffusion und dem photometrischen Farbstest

Es wurde die Plasminogenkonzentration in den 484 Seren der oben genannten Blutspender mit der radialen Immundiffusionsmethode auf Partigenplatten bestimmt und für die jeweiligen PLG-Phänotypen eine Durchschnittskonzentration errechnet. Hier zeigte sich ein etwas geringerer Gehalt an Plasminogen bei den seltenen Phänotypen PLG 1-R und PLG 2-R im Vergleich zu den häufigen Phänotypen.

264 Plasmen der oben genannten Blutspender wurden mittels des photometrischen Farbstests auf ihre Plasminogenaktivität, bzw. -konzentration untersucht und die Durchschnittswerte ebenfalls den PLG-Phänotypen zugeordnet. Auch hier zeigten sich niedrigere Werte bei den seltenen im Vergleich zu

den häufigen Typen. Allerdings lagen die Plasminogendurchschnittskonzentrationen, bzw. -aktivitäten aller Phänotypen-Gruppen innerhalb der postulierten Normalbereiche.

Ein Vergleich von Einzelergebnissen der Plasminogenbestimmungen mittels der beiden Methoden (Immundiffusion, Farbstest) zeigte, daß beide Methoden gleiche Aussagekraft besitzen.

Die Untersuchung einer Lebensaltersabhängigkeit der Plasminogenkonzentration bzw. -aktivität erbrachte mit beiden Methoden ein Maximum im Alter von 20 - 50 Jahren, dem ein Absinken ab etwa 50 Jahren folgt.

Die Einteilung der Ergebnisse nach dem Geschlecht der Probanden ergab mit beiden Methoden eine etwas höhere Plasminogendurchschnittskonzentration und -aktivität für die Gruppe der Frauen.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden einige der Blutspender anlaßlich einer erneuten Blutspende nach einem halben Jahr nochmals untersucht. Dabei wurden die PLG-Phänotypen der ersten Untersuchung bestätigt, die Plasminogenkonzentrationen (Partigenmethode) variierten nur unwesentlich.

In einem Alterungsversuch wurde die Minderung der immunologisch erfaßbaren Plasminogenkonzentration (Partigenmethode) nach einem Jahr Lagerung der Seren bei -37°C auf ca. 80% des Vorjahreswertes festgestellt. Bei der mittels des Farbstests erfaßten Plasminogenaktivität zeigte sich ein Abfall auf 50 - 60% des Ausgangswertes.

G LITERATURVERZEICHNIS

1. Barthels M (1982) Die Rolle der Fibrinolyse bei Blutstillungsstörungen und ihre Erkennung. Lab. med. 6: 274 - 277
2. Castellino F (1984) Molecular biology of human plasminogen. Abstract of the 18th Congress of the International Society of Blood Transfusion, München 1984, p 74
3. Dykes D, Nelson M, Polesky H (1983) Population distribution of PLG variants in 4 US racial groups using Agarose Isoelectric focusing. 10. int. Kongreß der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde, München 1983. Referateband: 439 - 445
4. Dykes D, Nelson M, Polesky H (1984) Five new variants of the serum protein Plasminogen. Abstract of the 18th Congr. of the Int. Soc. of Blood Transf., München 1984, p 75
5. Eiberg H, Mohr J, Nielsen L (1984) Rare alleles and some linkage relationships of plasminogen and coagulation factor XIII b. Abstract of the 18th Congr. of the Int. Soc. of Blood Transf., München 1984, p 75
6. Heimburger N (1980) Biochemie des Plasminogens und der Plasminogenaktivatoren. Veröffentlichung der Behringwerke AG
7. Hobart MJ (1979) Genetic polymorphism of human plasminogen. Ann. Hum. Genet. 42: 419 - 423

8. Hummel K, Jäger H, Krüger HJ (1983) Bestimmung der Phänotyphäufigkeiten im PLG-System bei Einwohnern der Stadt Mexico. *Ärztl. Lab.* 29: 198 - 200
9. Hummel K, Jäger H, Krüger HJ, Jäger G (1984) PLG typing with CelloigelTM membranes; results on sera from south-west Germany and of Mexico City. Abstract of the 18th Congr. of the Int. Soc. of Blood Transf., München 1984, p 189
10. Huseby R, Clavin S, Smith R, Hull R, Smithwick E (1977) Studies on tissue culture plasminogen activator. *Thrombosis Research*, Vol 10: 679 - 687
11. Jäger H, Krüger HJ, Hummel K (1983) Typisierung von PLG auf Celloigel-Folien; Resultate bei 97 Familien und 527 unverwandten Personen aus Südwestdeutschland. *Ärztl. Lab.* 29: 195 - 197
12. Jakobi E, Karges HE, Heimbürger N (1976) Plasminogenbestimmung als Routine-test. *Dtsch. med. Wschr.* 101: 1220 - 1222
13. Kuhl P, Spielmann W (1983) PLGN * 8, a new allele in the Plasminogen system. 10. int. Kongr. d. Ges. f. forens. Blutgruppenk., München 1983, Referateband: 592
14. Kuhl P, Spielmann W, Seidl S, Scharrer I (1984) Investigations of the polymorphisms of PLG and the subunits a and b of coagulation factor XIII. Abstract of the 18th Congr. of the Int. Soc. of Blood Transf., München 1984, p 75
15. Lattke H, Krone W (1983) Immunfixationselektrophorese auf Celloigel zur Bestimmung des Polymorphismus des menschlichen Plasminogens. *Elektrophorese Forum '83*: 337 - 341

16. Mauff G (1984) Plasminogen nomenclature proposal. Rundbrief
17. Mauff G, Erfurdt U, Wegrzynowicz Z, Pulverer G, Hummel K (1981)
Genetic Polymorphism of Human Plasminogen. In: Biomathematical
Evidence of Paternity, Eds. Hummel K und Gerchow J, Berlin - Heidel-
berg: 89 - 96
18. Mauff G, Erfurdt U, Pulverer G (1981) The Application of Human PLG
Polymorphism to Paternity testing. 9. Internationale Tagung der
Gesellschaft für Forensische Blutgruppenkunde, Bern 1981. Referate-
band: 531 - 535
19. Mauff G (1984) Genetics of Human Plasminogen. Abstract of the 18th
Congr. of the Int. Soc. of Blood Transf., München 1984, p 74
20. Nagl D, Bar A, Weidinger S, Gathof AG (1984) Qualitative and quantitative
determination of Plasminogen in blood donors of the Region of Nieder-
bayern/Oberpfalz. Abstract of the 18th Congr. of the Int. Soc. of
Blood Transf., München 1984, p 184
21. Nakamura S, Abe K (1984) Further Studies on Plasminogen Polymorphism in
the Japanese Population. Abstract of the 18th Congr. of the Int.
Soc. of Blood Transf., München 1984, p 74
22. Oepen I (1982) Rechtsmedizinische Blutgruppen-Serologie. Hg. Fresenius KG,
Bad Honburg
23. Osterhaus E, Birkner P, Arbeiter B (1983) Untersuchungen zur Methodik und
Ergebnisse beim Nachweis von PLG. 10. Int. Kongr. d. Ges. f. Forens.
Blutgruppenk., München 1983. Referateband: 433 - 438

24. Pascali ML, Lucchini P, Petrucci R, Auconi P (1984) Heterogeneity for plasminogen allotypes between white populations. Abstract of the 18th Congr. of the Int. Soc. of Blood Transf., München 1984, p 187
25. Pochron S, Mitchell G, Albareda I, Huseby R, Gargiulo R (1977)
A fluorescent substrate assay for plasminogen. *Thrombosis Research*, Vol 13: 733 - 739
26. Prokop O, Uhlenbruck G (1966) *Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen*. Thieme, Leipzig
27. Raum D, Marcus D, Alper C (1980) Genetic polymorphism of human plasminogen. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 681 - 689
28. Sachs V, Dörner R, Szirmai E (1984) Immunologically Determined Plasminogen Groups And Their Possible Biological Relevance. *Arztl. Lab.* 30: 115 - 118
29. Sachs V (1971) Immunologisch nachweisbare Unterschiede in der Struktur von menschlichem Plasminogen. *Bibliotheca Haematologica* No. 37, Ergebnisse der Bluttransfusionsforschung Vol XI: 428 - 433
30. Skoda U, Hitzeroth HW, Mauff G (1984) Polymorphism of human plasminogen in South African negroid populations. Abstract of the 18th Congr. of the Int. Soc. of Blood Transf., München 1984, p 188
31. Spaethe R (1984) *Hämostase - Physiologie, Pathophysiologie, Diagnostik*. Hg. AHS Deutschland, München: 51 - 54, 63 - 71, 142

32. Spielmann W, Kuhl P (1982) Erfahrungen mit neueren Blutgruppensystemen für die Vaterschaftsbegutachtung. *Arztl. Lab.* 28: 367 - 377
33. Thomas L (1984) *Labor und Diagnose*. Med. Verlagsges., Marburg: 483 - 484
34. Weidinger S, Schwarzfischer F, Müller H, Clevé H (1984) Genetic study of human plasminogen in Southern Germany. Abstract of the 18th Congr. of the Int. Soc. of Blood Transf., München 1984, p 184
35. Weidinger S, Schwarzfischer F, Müller H, Clevé H (1985) Plasminogen (PLG): A Useful Genetic Marker for Paternity Examinations. *Zeitschr. f. Rechtsmed.* 94: 165 - 171

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich ganz herzlich allen danken, die mir bei ihrem Entstehen Hilfe und Unterstützung gaben, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer, der mir das Thema überließ und meine Arbeit mit viel Herzlichkeit, Geduld und Rat begleitete.

Herrn Dr. S. Weidinger, der mir jederzeit mit wertvollen Hinweisen und großem Engagement entgegenkam.

Der Leitung des Blutspendedienstes des Bayerischen Roten Kreuzes, Herrn Direktor H. Hiedl, Herrn Arztl. Direktor Dr. med. A. G. Gathof und Herrn Geschäftsführer A. Vogt, für die Gewährung der Möglichkeit, die Untersuchung im Blutspendedienst des BRK durchzuführen, und für die wohlwollende Unterstützung meiner Arbeiten.

Den Firmen Boehringer und Behringwerke für Ihre Großzügigkeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Chefarztin des Regensburger Blutspendedienstes, Frau Dr. med. Anneliese Bar, die mir von Beginn bis Ende der Arbeit wertvoller Ratgeber, fruchtbarer Kritiker und stetiger Ansporn war und von der ich - nicht nur im Hinblick auf diese Arbeit - sehr viel gelernt habe.

Lebenslauf

Ich wurde am 30. Januar 1954 als erstes von 3 Kindern des kaufmannischen Angestellten Otto Nagl und seiner Ehefrau Johanna, geb. Kipke, in Straubing/Niederbayern geboren.

Nach dem Abitur am altsprachlich-humanistischen Turmair-Gymnasium in Straubing im Jahre 1973 begann ich im Wintersemester 1973/74 das Studium der Germanistik und des Lateins für das Lehramt an Gymnasien. Nach dem 1. Semester mußte ich mein Studium unterbrechen, da ich zum Zivildienst einberufen wurde, den ich von April 1974 bis Juli 1975 beim BRK Amberg (Unfallrettung und Krankentransport) als Sanitäter ableistete.

Dieser erste nachhaltige Kontakt mit der Medizin bewog mich zu einer Bewerbung um einen Studienplatz im Fach "Humanmedizin" bei der ZVS, der mir daraufhin für das Wintersemester 1975 an der Universität Regensburg zugeteilt wurde.

Nach dem 5. vorklinischen Semester absolvierte ich das Physikum und wechselte dann für den klinischen Ausbildungsteil an die TU München (Klinikum Rechts der Isar).

Im Jahre 1979 bestand ich den 1., im Jahre 1982 den 2. Teil der Ärztlichen Prüfung.

Das darauffolgende Praktische Jahr (PJ) leistete ich in den Pflichtfächern Innere Medizin und Chirurgie und im Wahlfach Gynakologie im Klinikum Rechts der Isar ab.

Am 07.04.1983 bestand ich den schriftlichen, am 15.04.1983 den mündlichen Teil des letzten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung; die Approbation als Arzt erhielt ich am 09. Mai 1983.

Am 26. Mai 1983 wurde mir von meiner Frau Annelies, geb. Danzl, mit der ich seit dem 30. September 1983 verheiratet bin, unser Sohn Sebastian geboren.

Mit Beginn des Juni 1983 trat ich die Stelle eines Assistenzarztes im Institut Regensburg des Blutspendedienstes des Bayerischen Roten Kreuzes (Chefärztin Dr. Anneliese Bär) an, wo ich seither tätig bin. Anfang 1984 wurde mir von Herrn Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer das Thema der vorliegenden Arbeit überlassen.

Regensburg, den 12.09.1985

detlev myl

